Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur oralen und intravenösen Glycerintoleranz

Werner Feigenbutz

1971

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut des Städt. Krankenhauses
München-Schwabing
Direktor Prof. Dr. O. Wieland
und aus dem Klinisch-Chemischen Institut der Stoffwechselklinik
Bad Mergentheim
Direktor Dr. L. Wannagat, Institutsleiter Dr. G. Hermann

KLINISCH-EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ORALEN UND INTRAVENÖSEN GLYCERINTOLERANZ

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Werner F e i g e n b u t z
aus Mannheim

1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Otto Wieland
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Walter Seitz
Dekan: Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 8. 6. 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Entdeckung der Glycerokinase	1
Vorkommen der Glycerokinase	2
Stoffwechsel des Glycerins	4
Triglycerid- und Phosphatidsynthese	5
α-Glycerophosphat-Cyclus	5
Enzymatische Glycerinbestimmung	7
Thema der Arbeit	8
Methodik	10
Versuchsbedingungen	10
Bestimmungsmethoden:	
Freies Glycerin nach O.Wieland	12
Freies Glycerin nach F.H.Kreutz	16
Gesamtglycerin	18
Ester-Glycerin	19
Triglycerid	19
Gesamt-Cholesterin	20
Freies Cholesterin	21
Ester-Cholesterin	23
Lipoidphosphor	24
Phosphatide	26
Gesamtveresterte Fettsäuren	27
Nichtveresterte Fettsäuren (FFS)	29
Glucose	31
Ergebnisse	34
Serumglycerinspiegel normal und bei verschiedenen Erkrankungen	34
Harnkonzentration	38
Serumglycerin nach Fettbelastung	38
Serumglycerin nach Fructosebelastung	38

Seite

Serumglycerin nach oraler Glycerinbelastung 41

Glycerinbelastung bei akuter Hepatitis 42

Zusätzliche Bestimmung weiterer Metabolite 44

Intravenöse Glycerinbelastungen 46

Intravenöse Glycerinbelastungen an 17 gesunden und 15 kranken Versuchspersonen 49

Eliminationskoeffizient 50

Typische Abweichungen vom Normalen 52

Diskussion 78

Zusammenfassung 82

Literatur 84

Einleitung

Glycerin ist eine Verbindung von beträchtlicher physiologischer Bedeutung. Es entsteht im lebenden Organismus als Zwischenprodukt des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels. Es bildet den wesentlichen Baustein der Triglyceride und der Phosphatide und ist damit Bestandteil aller biologischer Membrane.

Biochemische Erkenntnisse der beiden letzten Jahrzehnte haben uns die Enzymsysteme gezeigt, die den Stoffwechsel der Kohlenhydrate mit dem der Fette über die Stufe des Glycerins miteinander verbinden.

In der früheren Literatur sind über den Glycerinstoffwechsel bei Mensch und Tier relativ wenig Daten zu finden. Dies geht sicher zu einem beträchtlichen Teil auf methodische Schwierigkeiten zurück. Erst nach Einführung spezifischer und für den wissenschaftlichen Gebrauch geeigneter Bestimmungsmethoden (114) konnte die Forschung auf diesem Gebiet einen rapiden Aufschwung nehmen.

Entdeckung der Glycerokinase

Als erste Ergebnisse von Versuchen an tierischen Geweben konnten Cori und Shine (20) 1935 an Leberschnitten, Kalckar (60) 1937 in Extrakten aus Nierengewebe zeigen, daß beide Gewebe imstande sind, Glycerin zu phosphorylieren. Vorausgesetzt war das Vorhandensein eines Phosphatenergie erzeugenden aeroben Systems. Auch Glycerinaldehyd, Glycerinsäure und Dihydroxyaceton konnten in diesen Versuchen als Substrate dienen (72). Später folgten Nachweise der Glycerinphosphorylierung durch verschiedene Bakterienarten (36, 4, 47, 75, 45).

Einen wichtigen Schritt bedeutete die Aufklärung des Mechanismus der Glycerinphosphorylierung durch Bublitz und Kennedy (12 , - , -) 1954. Sie konnten in Rattenlebern ein Enzym nachweisen, das sie Glycerokinase nannten. Es katalysiert folgende Reaktion:

Glycerin + ATP ---→ L - ∝ - Glycerophosphat + ADP

O. Wieland isolierte Glycerokinase aus Taubenleber und definierte es näher (119). Dabei ergab sich eine sehr hohe Substrataffinität zu Glycerin mit einer Michaeliskonstante $K_M = 3 \times 10^{-5}$ Mol/l, die die physiologische Bedeutung des Glycerins als Stoffwechselsubstrat unterstrich. Die Spezifität und Affinität der Glycerokinase boten auch günstige Voraussetzungen für die Ausarbeitung einer enzymatischen Bestimmungsmethode von Glycerin.

Vorkommen der Glycerokinase

Glycerokinase findet sich überwiegend in Leber und Niere (119). Das steht im Gegensatz zum ubiquitären Vorkommen der Enzyme des Fettstoffwechsels. Mit besonders empfindlichen Isotopenmethoden konnte Glycerokinase von Newsholme, Robinson und Taylor 1960 auch im Herzmuskel (86), im Fettgewebe (80), im Skelettmuskel (79) und von anderer Seite auch in der Dünndarmschleimhaut (19, 37) in geringen Aktivitäten nachgewiesen werden.

Für den Umsatz des Glycerins dürften somit quantitativ Leber und Niere die ausschlaggebenden Organe sein, während das sehr stoffwechselaktive Fettgewebe wohl die hauptsächliche Bildungsstätte des Glycerins im Organismus darstellt. Hier findet aber offenbar keine nennenswerte Utilisation von Glycerin statt. Allerdings finden sich neuerdings Hinweise, daß im Fettgewebe genetisch fettsüchtiger Mäuse höhere Aktivitäten an Glycerokinase als in normalem Fettgewebe vorliegen (64).

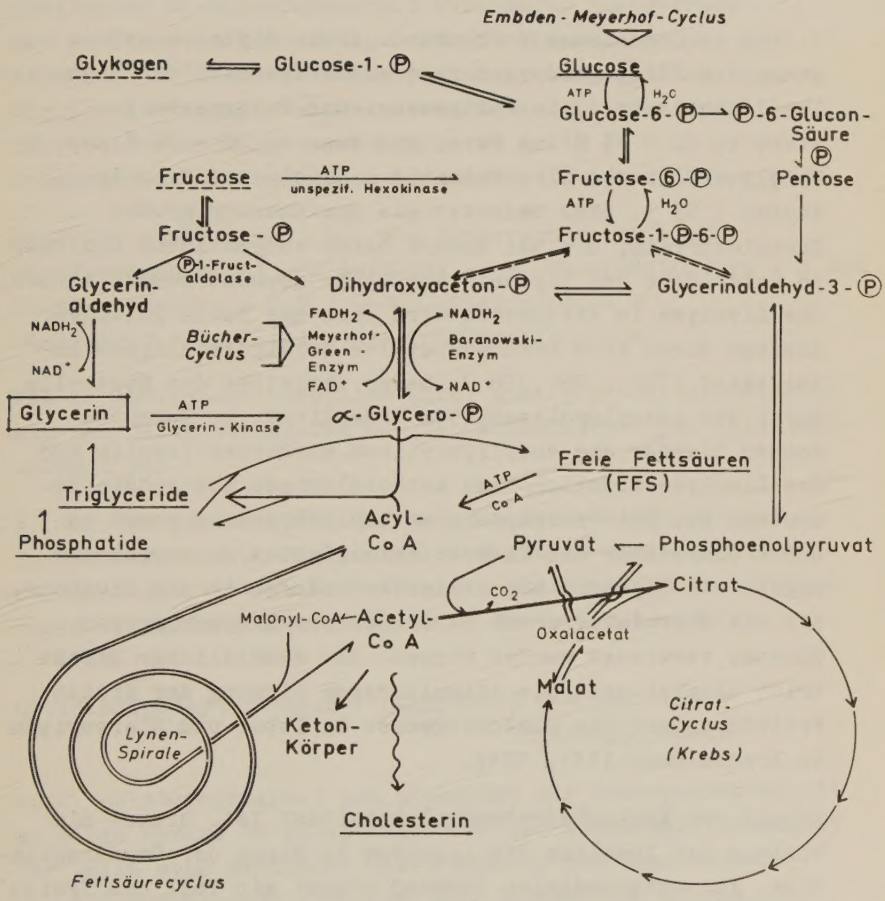

Embden - Meyerhof - Cyclus
Glykogen
Glucose-1-Ⓟ
Glucose
ATP
H2O
Glucose-6-Ⓟ
Ⓟ-6-Glucon-Säure
Ⓟ
Pentose
Fructose
ATP
unspezif. Hexokinase
Fructose-Ⓟ
Fructose-6-Ⓟ
ATP
H2O
Fructose-1-Ⓟ-6-Ⓟ
Ⓟ-1-Fruct-aldolase
Glycerin-aldehyd
Dihydroxyaceton-Ⓟ
Glycerinaldehyd-3-Ⓟ
NADH2
NAD+
Bücher-Cyclus
FADH2
Meyerhof-Green-Enzym
FAD+
NADH2
Baranowski-Enzym
NAD+
Glycerin
ATP
Glycerin-Kinase
α-Glycero-Ⓟ
Freie Fettsäuren (FFS)
ATP
Co A
Triglyceride
Phosphatide
Acyl-Co A
Pyruvat
Phosphoenolpyruvat
CO2
Citrat
Malonyl-CoA
Acetyl-Co A
Oxalacetat
Malat
Lynen-Spirale
Keton-Körper
Citrat-Cyclus (Krebs)
Cholesterin
Fettsäurecyclus

Abbildung 1

Stoffwechsel des Glycerins

Zusammenfassend läßt sich die Rolle des Glycerins wie folgt darstellen (siehe auch Abbildung 1):

1. Das im Organismus vorkommende freie Glycerin entstammt im Nüchternzustand fast ausschließlich der Lipolyse (Abbildung 1) im Fettgewebe. Das Fettgewebe besteht zu 60 - 85 % aus Fett, und zwar zu 90 - 99 % aus Triglyceriden der Öl-, Palmitin-, Linol- und Stearinsäuren (95). Dies bedeutet die Speicherung großer Energievorräte, die bei Bedarf durch enzymatische Spaltung in Fettsäuren und Glycerin verfügbar gemacht werden können. Die Lipolyse im Fettgewebe wird nach der heute gültigen Annahme durch eine hormonsensitive Triglyceridlipase katalysiert (73 , 85 ,108), deren Aktivität der Kontrolle durch das Adenylcyclasesystem unterliegt. An Hormonen kommen hierfür dem antilipolytisch wirkenden Insulin und den Lipolysestimulierenden Katecholaminen die größte Bedeutung zu. Bei Verknappung an Kohlenhydraten kommt es durch Überwiegen des Katecholamineffektes zu vermehrter Abgabe von Glycerin und freien Fettsäuren in die Blutbahn, die als Energieliefernde Substrate zur Einsparung von Glucose verwendet werden können. Als zusätzlicher Effekt tritt hierbei noch die stimulierende Wirkung der freien Fettsäuren auf die Gluconeogenese in Leber und Nierenrinde in Erscheinung .(111, 121).

Sobald der Kohlenhydratmangel beseitigt ist, bremst die Wirkung des Insulins die Lipolyse im Sinne der Gegenregulation. Im postprandialen Zustand stammt ein Teil des freien Serumglycerins auch aus dem Nahrungsfett, besonders nach fettreicher Mahlzeit (siehe auch Seite 38).
Der theoretisch mögliche Weg der Entstehung von Glycerin aus dem Fructoseabbau (Abbildung 1) scheint im Organismus keine wesentliche Rolle zu spielen (siehe auch Seite 39).

2. Für die Utilisation des Glycerins stellt die Glycerokinasereaktion den einleitenden Schritt dar. Glycerin wird in Leber und Niere rasch phosphoryliert. Aus dem gebildeten α-Glycerophosphat kann durch Veresterung mit aktivierten Fettsäuren zunächst Phosphatidsäure entstehen (63). Das nach Phosphatabspaltung gebildete Diglycerid reagiert mit einer weiteren aktivierten Fettsäure unter Bildung von Triglycerid (113).
Folgende Reaktionen laufen bei der Neutralfettbildung ab:

Glycerin + ATP ---> L - α - Glycerophosphat + ADP
α-Glycerophosphat + 2 Acyl-CoA ---> Phosphatidsäure + 2 CoA
Phosphatidsäure + H_2O ---> Diglycerid + P
Diglycerid + Acyl-CoA ---> Triglycerid + CoA

Wie in Abbildung 1 deutlich wird, stellt α-Glycerophosphat ein zentrales Bindeglied für den Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel dar.

3. Auf dem gleichen Weg beginnt die Phosphatidsynthese. In das entstandene Diglycerid wird jedoch anstelle einer weiteren aktivierten Fettsäure die stickstoffhaltige Komponente eingeführt, zum Beispiel im Falle des Lecithins (61):

Cytidindiphosphatcholin + Diglycerid ---> Lecithin + Cytidinphosphat

4. α -Glycerophosphat ist ausserdem als Transportmetabolit an einem Cyclus beteiligt, der für den Wasserstofftransport der Zelle eine besondere Rolle spielt, dem sogenannten α -Glycerophosphat - Cyclus (Th. Bücher)(14 , 13). Seine Funktion ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

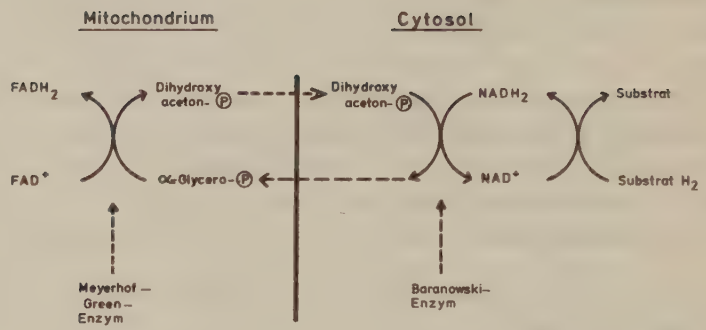


Abbildung 2 Glycerophosphat-Cyclus (Th. Bücher)

Auf diese Weise kann Wasserstoff aus dem Cytosol zur Verbrennung in die Mitochondrien eingeschleust werden. In diesem Cyclus wirken zwei Enzyme zusammen: Das Baranowski-Enzym, das in Muskel und Leber zu finden ist, überträgt (5) den Wasserstoff auf das α-Glycerophosphat. Das Meyerhof-Green-Enzym (34), das ausschließlich an die Struktur der Mitochondrien in Leber und Muskel gebunden ist (76), überträgt dann den Wasserstoff auf das Flavinsystem und damit auf die Atmungskette.

5. Schon frühzeitig wurde erkannt, daß Glycerin antiketogen wirksam ist. So konnte N. L. Edson (23) zeigen, daß Glycerin die Acetessigsäurebildung durch Leberschnitte erheblich herabsetzt. Auf Grund der Beobachtung, wonach Glycerin in vitro den Einbau von ^{14}C-Acetat in die Fettsäuren in Leberschnitten stimuliert (8118), wurde angenommen, daß der antiketogene Effekt des Glycerins primär auf einer Steigerung der Lipidsynthese beruht.

Dies würde sich von der antiketogenen Wirkung anderer Substanzen wie zum Beispiel Fructose und Glucose unterscheiden. Experimentelle Hinweise für diese Vorstellung wurden von O. Wieland und F. Matschinsky (117) erhoben, die zeigen konnten, daß es nach Gaben von antiketogenen Glycerindosen zu einem beträchtlichen Anstieg von α -Glycerophosphat in der Leber kommt. Letzteres begünstigt als Acceptor langkettiger Fettsäuren die Lipidsynthese (siehe Abbildung 1). Dadurch wird die Fettsäureoxydation gedrosselt und die Endoxydation von Acetyl-CoA wieder in Gang gesetzt.

6. Als Substrat für die Glukose-Neubildung kann dem Glycerin in Leber und Niere ebenfalls physiologische Bedeutung zukommen. Der Weg der Glukoneogenese verläuft zunächst ebenfalls über die Stufe des α-Glycerophosphats und sodann über Dihydroxyacetonphosphat - mit zwei Ausnahmen - rückläufig über die Reaktionen der Glykolyse zur Glukose. Diese Ausnahmen stellen die Umwandlungen von Fructose-1,6-diphosphat in Fructose -6-Phosphat dar, die nicht am Enzym Phosphofructokinase sondern an einer spezifischen Hexosediphosphatase erfolgt (siehe Abbildung 1) und entsprechend die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Glucose. (122, 109)

Enzymatische Bestimmungsmethode für Glycerin

Aus der großen Zahl der analytischen Verfahren zur Glycerinbestimmung, wie sie hauptsächlich für industrielle Belange entwickelt wurden, haben sich nur wenige für den Gebrauch im wissenschaftlichen Laboratorium heranziehen lassen. Dies gilt sowohl für die Methode der Oxydation mit Perjodsäure oder ähnlichen Reagentien und nachfolgender Bestimmung der verbrauchten Oxydationsmittel bzw. der Reaktionsprodukte, als auch für colorimetrische Verfahren, von denen eines z.B. auf der Rotfärbung eines Gemisches von Glycerin und

Brenzcatechin nach Erhitzen beruht. In allen Fällen stellte die mangelnde Spezifität der Reaktionen ein wesentliches Hindernis dar, das erst durch zeitraubende Vorarbeiten mit dem Ziel der Entfernung störender Begleitsubstanzen aus dem Wege geräumt werden mußte.

Aus diesem Grunde ergab sich für die Aufnahme systematischer Untersuchungen über den Stoffwechsel des Glycerins, denen auch im Hinblick auf klinische Fragestellungen der Charakter von Reihenbestimmungen zukommen sollte, das Bedürfnis nach einer empfindlichen und dabei leicht zu handhabenden Bestimmungsmethode für Glycerin.

Eine solche wurde 1957 beschrieben (114). Es handelt sich um einen optisch-enzymatischen Test auf der Basis der Glycerokinasereaktion, der den Weg für weiteres Arbeiten auf diesem Sektor eröffnete. Die Methode wurde später mehrfach modifiziert (66,17,107,91,32,94,69,42,81,44).

Thema der Arbeit

Nach Einführung der enzymatischen Glycerinbestimmung in die Klinik ließ sich teils in eigenen Untersuchungen, die an anderer Stelle veröffentlicht wurden (119, 115, 98), teils in Arbeiten anderer Autoren (97) übereinstimmend zeigen, daß Glycerin im menschlichen Blutserum in ziemlich konstanten, wenn auch geringen Konzentrationen vorkommt. In Rattenorganen wurde ebenfalls freies Glycerin nachgewiesen, wobei die Höhe des Glycerinspiegels sich umgekehrt proportional dem Gehalt an Glycerinkinase in den betreffenden Organen verhielt (119).

Auf Grund dieser Befunde erschien es von Interesse, beim Menschen den Serum-Glycerinspiegel unter verschiedenen Bedingungen zu verfolgen und die Auswirkung von exogener Glycerinbelastung auf die Serumspiegel anderer Metabolite

des Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels zu untersuchen. Für diese Untersuchungen war es anfangs nötig, Glycerokinase aus Taubenleber selbst herzustellen. Erst später stand ein kommerziell hergestelltes Glycerokinasepräparat zur Verfügung. Damit war es dann möglich, die folgenden ausgedehnteren Untersuchungen durchzuführen.

M e t h o d i k

Auswahl der Versuchspersonen

Als Normalfälle wurden nach Anamnese und klinischer Untersuchung gesunde, unter 40 Jahre alte Versuchspersonen herangezogen. Für die späteren Belastungstests mit 75 mg/kg Körpersollgewicht wurden darüber hinaus ausschließlich 18 - 20-jährige männliche Probanden ausgewählt, bei denen durch Laboruntersuchung des Serumbilirubins, der Serumeiweißverhältnisse und der Transaminasen auch eine Leberparenchymschädigung mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte.
Die ausgesuchten pathologischen Leberfälle hatten klinisch und labortechnisch exakt gestellte Diagnosen aufzuweisen, die fast durchweg durch histologische Untersuchung von Biopsiematerial erhärtet waren. Die übrigen pathologischen Fälle waren stationäre Patienten, bei denen die Diagnosen in der 1. und 2. Medizinischen Klinik der Universität München gestellt worden waren.

Glycerinbelastung

Den nüchternen Probanden wurde eine Verweilkanüle in eine Cubitalvene gelegt und, nach Entnahme von 10 ml Blut als Nullwert, am anderen Arm Glycerin intravenös injiziert in unten näher angeführter Dosierung. Beim oralen Belastungstest wurde Glycerin in Tee verabreicht. Die Nüchternblutprobe und die zeitlich festgelegten und nach Stoppuhr kontrollierten weiteren Probenentnahmen wurden frei fließend aufgefangen und im Eiswasserbad bis zur Gerinnung aufbewahrt.

Belastungsschema der Glycerinbelastungen:

	mg/kg Körpersoll-gewicht	Anzahl	Blutentnahme nach Minuten
Normalfälle	75 i.v.	17	1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40
Pathol. Fälle	75 i.v.	15	1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40
Pathol. Fälle	200 oral	12	10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180
Pathol. Fälle	50 i.v.	5	1/2, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 35, 40

Es wurden folgende Metabolite bestimmt bzw. berechnet:

Im Serum:

Gesamt-Glycerin
Freies Glycerin
Ester-Glycerin
Triglyceride
Gesamt-Cholesterin
Freies Cholesterin
Ester-Cholesterin
Phosphatide
Lipiodphosphor
gesamtveresterte Fettsäuren
Freie Fettsäuren
Glucose

Im Harn:

Freies Glycerin

Die Bestimmungen erfolgten im Nüchternurin und in je einer Probe des volumenmäßig erfaßten

a) Harns nach Testende
b) Sammelharns bis 19,oo Uhr des Untersuchungstages und
c) Sammelharns der Nacht einschliesslich Morgenurin des folgenden Tages.

Der Dosierung der Glycerinbelastungsversuche nach Milligramm pro Kilogramm Körpersollgewicht liegt die Überlegung zugrunde, daß die Belastung auf das Lebergewicht bezogen sein sollte. Die sonst üblichen Belastungstests beziehen sich dagegen auf das tatsächliche Körpergewicht des Patienten und lassen dabei unberücksichtigt, daß das Volumen des Leberparenchyms nicht mit dem Körpergewicht gleichlaufend zu- oder abnimmt, sondern vielmehr einer Funktion aus Körpergröße und Lebensalter zu folgen scheint (88,11). Auch wenn dabei der Faktor Konstitution noch nicht genügend berücksichtigt ist, wurde das Tabellengewicht entsprechend Körpergröße, Lebensalter und Knochenbau nach Stuart und Stevensen (100) als Körpersollgewicht angenommen.

Die Glycerinlösung zur intravenösen Injektion war 30%ig, hergestellt aus Glycerin anhydric. p.a. (Fa. Merck) in physiologischer Kochsalzlösung steril, 0,9 %, auf Pyrogenfreiheit geprüft.

Bestimmungsmethoden

Bestimmung des freien Glycerins nach O. Wieland (114,116)

Prinzip: Glycerin wird bei vorhandener ATP durch Glycerokinase in L -α- Glycerin-1-Phosphat überführt. Als Indikator-Reaktion dient die Dehydrierung von L -α -Glycerin-1-Phosphat durch das NAD^+-abhängige Enzym α-Glycerophosphat-Dehydrogenase (GDH = Baranowski-Enzym).

I. Glycerin + ATP $\xrightarrow{\text{Glycerokinase}}$ L - α - Glycerin-1-Phosphat + ADP

II. L - α - Glycerin-1-Phosphat + NAD^+ $\xrightleftharpoons{\text{GDH}}$ Dihydroxyaceton-phosphat + $NADH_2$

Das gebildete $NADH_2$ ist der vorgelegten Glycerinmenge äquivalent. Um das Gleichgewicht der Indikatorreaktion, das weit auf der linken Seite liegt, in die gewünschte Richtung zu verschieben, wird bei pH = 9,8 gearbeitet. Dihydroxyacetonphosphat wird durch Hydrazin abgefangen.

Reagentien:

I. Puffer (Glycin 0,2 M, Hydrazin 1 M, $Mg^{2+}2.10^{-3}M$; pH = 9,8):

Hydrazinhydrat (24 % w/v)	20,8 g
Glycin	1,5 g
$MgCl_2$ 1 M	0,1 ml
aqua bidest ad	100,0 ml

Haltbar 4 - 6 Wochen in dunkler Flasche bei 4° C.

II. Perchlorsäure (ca. 30 % w/v):

$HClO_4$ (Dichte = 1,67)	25,5 ml
aqua bidest ad	100,0 ml

III. Perchlorsäure (ca. 3 % w/v):

Lösung II	10 ml
aqua bidest ad	100,0 ml

IV. Adenosintriphosphat (ATP 0,05 M):

ATP-Na_2H_2 . 3 H_2O (Reinheit 98 %)	60,5 mg
gelöst in ca. 1 ml aqua bidest mit NaOH neutralisiert	
aqua bidest ad	2,0 ml

V. Diphospho-Pyridinnucleotid (NAD ca. 0,02 M):

ß-NAD (enzymatisch aktiv, ca. 85 %)	34,6 mg
gelöst in aqua bidest	2,0 ml

VI. Glycerophosphat-Dehydrogenase, GDH (ca. 7 mg Protein/ml): in Ammoniumsulfat-Lösung 2,0 M suspendiert. Handelspräparate damit entsprechend verdünnt.

VII. Glycerokinase GK (ca. 60 Einheiten/ml):
GK aus Taubenleber nach (119) isoliert. Vor Verwendung der GK wurde das Glycerin entfernt, das bei der Anreicherung als Stabilisator zugesetzt worden war. Das Enzym wurde mehrmals mit Ammoniumsulfat-Lösung (2 M) gewaschen, in welcher das Protein zuletzt wieder suspendiert wird. Später stand das kommerzielle Glycerokinase-Präparat der Firma C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim, zur Verfügung, das frei von Glycerin ist.

Durchführung:

Plasma aus NaF-Blut (4 mg/ml) wurde enteiweißt, und zwar 1 ml Plasma mit 0,1 ml Perchlorsäurelösung (II) versetzt, mit feinem Glasstab gut durchgemischt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit ca. 0,5 ml Perchlorsäure 3%-ig (III) gewaschen und die Waschlösung mit dem ersten Niederschlag vereinigt. Mit KOH 10 N wurde das pH auf 9,0 - 9,5 gebracht, dann mit aqua dest. auf 2,5 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten bei 4°C wurde der $KClO_4$-Niederschlag rasch abzentrifugiert und der klare Überstand zur Glycerinbestimmung verwendet.

Testansatz:

In eine Schmalküvette von 2 cm Schichtdicke werden gegeben:

Puffer-Lösung	(I)	1,37 ml
GDH - Suspension	(VI)	0,02 ml
ATP - Lösung	(IV)	0,05 ml
DPN - Lösung	(V)	0,05 ml
enteiweißte Probe		0,50 ml

Die Extinktion E_1 bei 366 mμ gegen Luft gemessen wurde beobachtet bis sie konstant blieb oder eine gleichbleibende Geschwindigkeit erreicht hatte (Leerschleich).

Dann Start mit:

GK - Suspension (VII) 0,01 ml

Die Extinktionszunahme wurde bis zum Endwert E_2 verfolgt. Wird kein fester Endwert erreicht, so muß E_2 aus dem mit minimaler Geschwindikeit laufenden "Nachschleich" extrapoliert werden. Zuletzt wurde die Eigenextinktion der GK Suspension festgestellt durch nochmalige Zugabe der gleichen Menge wie beim Start nach Testende.

Die Extinktionszunahme $E = E_2 - E_1$

Berechnung:

Pro Mol Glycerin entsteht 1 Mol $NADH_2$. Der Extinktionskoeffizient von $NADH_2$ bei 366 mμ ist $\varepsilon = 3{,}3$ (cm^2/μ Mol) (53).

Nach der Beziehung:

$$\frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d} = \mu \text{ Mol Substanz / Testansatz}$$

(V = Testvolumen in der Küvette in ml, D = Schichtdicke in cm) ergibt sich die Glycerinkonzentration zu:

$$\frac{E_{366}}{3{,}3} = \mu \text{ Mol Glycerin / Testansatz}$$

Da 0,5 aus 2,5 ml enteiweißtes Plasma eingesetzt worden sind, so ist:

$$\frac{E_{366} \cdot 5}{3{,}3} = E_{366} \cdot 1{,}52 = \mu \text{ Mol Glycerin/ml Plasma}$$

oder

$$E_{366} \cdot 1{,}52 \cdot 9{,}2 = \text{mg \% Glycerin im Plasma}$$

Spezifität:

In der beschriebenen Anordnung ist der Test spezifisch für Glycerin, da GDH ausschließlich mit L - α - Glycerin - 1 - phosphat reagiert.

Wie bei allen enzymatischen Bestimmungen, bei denen gegen das Reaktionsgleichgewicht gearbeitet wird, ist auch bei der Glycerinbestimmung die lange Dauer bis zum Abschluß der Reaktion von Nachteil. Es sollten daher große Enzymmengen für den Test verwendet werden.

Bestimmung freien Glycerins nach F. H. Kreutz (66)

Prinzip: Als Grundlage wird auch hier von der durch Glycerokinase katalysierten Bildung von L - α - Glycerin-1 - phosphat aus Glycerin ausgegangen. Dann wird jedoch über eine Hilfsreaktion zur Indikatorreaktion dreistufig vorgegangen, wie auch von Garland und Randle (32) beschrieben, entsprechend folgendem Schema:

I. Glycerin + ATP $\xrightarrow{\text{Glycerokinase}}$ L - α - Glycerin - 1 - Phosphat + ADP

(Exergonische, zu Ende laufende Reaktion (12)).

II. Hilfsreaktion:
Phosphoenolphosphat + ADP $\xrightarrow{\text{Pyruvatkinase}}$ Pyruvat + ATP

III. Indikatorreaktion:
Pyruvat + $NADH_2$ $\xrightarrow{\text{Lactatdehydrogenase}}$ Lactat + NAD^+

Die der Glycerophosphatbildung äquivalente (52) Oxydation von $NADH_2$ durch Pyruvatreduktion wird durch Extinktionsabnahme bei 366 mμ gemessen. Hier liegt das Gleichgewicht für die Reaktion III. mit $K = 1 \cdot 10^4$ 1/M (pH 7,6) weit auf der Lactatseite, das der Reaktion I. und II. ($K = 2 \cdot 10^3$, 30^o) auch deutlich auf der ATP bzw. Pyruvatseite (1). Das kommt den an eine Endwertmethode gestellten Forderungen am nächsten.

Reagentien:

I. Triaethanolamin-Puffer (TRA-Puffer) mit $MgSO_4$, pH 7,6:

Triaethanolamin (0,1 m)	14,92 g	(Fa. Merck p.a.)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,986 g	(Fa. Merck p.a.)
Aqua bidest ad	ca.800,0 ml	mit NaOH auf pH 7,6 gebracht
Aqua bidest ad	1000,0 ml	

II. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert ($NADH_2$) 0,02 m

$NADH_2$ (Boehringer DPNH 15142)	14,0	mg
$NaHCO_3$ 1 %-ig, wässrig	1,0	ml

III. Adenosintriphosphat (ATP) 0,1 m

ATP - Na crist. (Boehringer ATP 15028)	60	mg
Aqua bidest	1,0	ml

IV. Phosphoenolpyruvat (PEP) 0,05 m
Tricyclohexylammonium-Phosphoenolpyruvat
(Boehringer PEP C 15308)

V. Lactatdehydrogenase/Pyruvatkinase
(LdH/PK) = 2,5 bzw. 1 mg/ml

LDH (Boehringer 15145) 5 mg/ml, spez. Aktiv.	ca. 360 E/mg	0,5 ml
+ PK (Boehringer 15744) 2 mg/ml, spez.Aktiv.	ca. 125 E/mg	0,5 ml

VI. Glycerokinase (GK) (Boehringer GK 15746)
1 mg/ml, spez. Aktiv. ca. 85 E/mg

Testansatz:
In eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) werden gegeben:

TRA - Puffer	(I)	1,50 ml
$NADH_2$	(II)	0,02 ml
ATP	(III	0,02 ml
PEP	(IV)	0,02 ml
Serum		0,3 ml
LDH/PK	(V)	0,015 ml

Nach 10 Minuten fortlaufender Messung am Photometer Eppendorf bei 366 mμ (= Extinktion E_1) Zugabe von:

GK (VI) 0,02 ml

Erneut fortlaufende Messung (Automat. Schreiber oder in 1 Min.-Abstand) von 4 - 5 Minuten und Bestimmung von Extinktion E_2 . Dabei wird der "Leerschleich" durch Extrapolation ausgeglichen.

Berechnung:

$$\frac{E_{366} \cdot Vol}{\varepsilon \cdot d} = \frac{E \cdot 1{,}875}{3{,}3} = \mu \text{ Mol/Testansatz}$$

$$\frac{E \cdot 1{,}875 \cdot 3{,}33}{3{,}3} = E \cdot 1{,}89 = \mu \text{ Mol Glycerin/ml Serum}$$

$$E \cdot 1{,}89 \cdot 9{,}2 = E \cdot 17{,}4 = \text{mg \% Glycerin im Serum}$$

Bestimmung von Gesamtglycerin

Prinzip:
Das Gesamtglycerin (= Triglyceridglycerin plus Freies Glycerin) wird, nach Verseifung der Triglyceride mit äthanolischer Kalilauge, als freies Glycerin bestimmt.

Reagentien:

I. KOH in Äthanol 0,5 n

KOH (25 %-ig, Merck 5024)		11,2 ml
Äthanol (ca. 95 %, Merck 969)	ad	100,0 ml

II. Perchlorsäure 3 n

$HClO_4$ (70 %-ig, Merck 519)		25,5 ml
Aqua bidest	ad	100,0 ml

Durchführung:

In ein verschließbares Mikrogefäß: Äthanol. KOH (I) 1,0 ml
dazu tropfenweise Serum 0,2 ml
Zur Inkubation 30 Minuten verschlossen in Wasserbad (70°C) gebracht, dazu nach Abkühlung zur Neutralisation:
Perchlosäure (II) 0,12 ml
Nach 30 Minuten Aufbewahren im Eiswasserbad (pH-Kontrolle (pH7)) wird der Eiweiß-Perchlosäure-Niederschlag scharf abzentrifugiert.
Vom Überstand 0,3 ml in den Testansatz wie für freies Glycerin.

Berechnung:

$E_{366} \cdot 122$ = mg % Gesamtglycerin im Serum

Berechnung des Ester-Glycerins

Prinzip:

Das Ester-Glycerin (Triglycerid-Glycerin) wird nach Eggstein und Kreutz (25) errechnet nach der Formel:

mg % Gesamtglycerin - mg % freies Glycerin = Ester-Glycerin

Berechnung der Triglyceride (25)

Prinzip:
Triglyceride sind Glycerin-Ester höherer, unverzweigter, gesättigter und ungesättigter Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 - 24 C-Atomen.

Die Triglyceride werden errechnet nach der Formel (Eggstein und Kreutz (25)):

Triglyceride = mg % Ester-Glycerin · 9,62

Der Faktor resultiert aus der Gesamtformel:

$$\text{Triglyceride} = \frac{\text{Ester-Glycerin}}{\text{Mol. Gew. d. Glycerin } 92} \cdot \text{Mittl. Mol. Gew. d. Serumtriglycerid } 885$$

$$= \text{Esterglycerin} \cdot \frac{885}{92}$$

Bestimmung des Gesamt-Cholesterins

Prinzip:

Cholesterin bildet nach der Liebermann (71) und Burchard' schen (15) Reaktion polymere ungesättigte Kohlenwasserstoffe von blaugrüner Farbe, die kolorimetrisch quantitativ erfasst werden können. Eine vorherige Extraktion des Cholesterins oder eine Eiweißfällung erübrigt sich bei der von Pearson, Stern und Mc. Gavack (82) beschriebenen Methode, bei der das Serumeiweiß durch 2,5-Dimethylbenzolsulfonsäure in Lösung gehalten wird, Wir arbeiten nach der Modifikation von Watson (110) und Hoeflmayr und Fried (51).

Reagentien:

I. Dimethylbenzolsulfonsäure 0,05 m in Essigsäure:

2,5-Dimethylbenzolsulfonsäure	1 Vol. Teil
Eisessig	1 Vol. Teil
Essigsäure anhydr.	3 Vol. Teil

II. Cholesterin-Standardlösung 400 mg %

III. H_2SO_4 conc. p.a.

Durchführung:

Für jede Analyse wird auch ein Standard- und ein Reagentienleerwert angesetzt. In trockene Reagenzgläser werden gegeben:

Analyse		Reagentienleerw.		Standardwert	
Dimethyolbenzolsulfons. (I)	5,0 ml		5,0 ml		5,0 ml
Serum (haem.frei)	0,1 ml	Aqua dest.	0,1 ml	Standard	0,1 ml

Nach 10 Minuten Abkühlen Zugabe von:

H_2SO_4 conc.(III)	1,0 ml		1,0 ml		1,0 ml

Bei Zimmertemperatur wird nach 15 Minuten mit Photometer Eppendorf bei 578 mμ, Schichtdicke 1 cm, die Extinktion gegen Leerwert gemessen. (Farbkonstanz dann ca. 10 bis 20 Minuten (93)).

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion}_{\text{analyse/Leerwert}}}{\text{Extinktion}_{\text{Standardw./Leerw.}}} \cdot 400 = \text{mg \% Gesamt-Cholesterin}$$

Standardreagens = 400 mg% Cholesterin

Bestimmung des freien Cholesterins

Prinzip:
Das freie Cholesterin wird als Digitonid zusammen mit dem Serumeiweiß gefällt (Schoenheimer und Sperry (96) und Searcy und Bergquist (90). Die Fällung ist vollständig. Mit dem Niederschlag wird direkt nach der oben angeführten Methode die Liebermann-Burchard'sche Farbeaktion durchgeführt und kolorimetrisch gemessen, da die 1,5-Dimethyl-

benzolsulfonsäure den Niederschlag wieder in Lösung bringt ( ). Durch Verwendung eines Digitonin-Cholesterin-Standards (Hoeflmayr und Fried (50)) wird dabei eine Verfälschung der Werte umgangen, die infolge Eigenfarbreaktion des Digitonins eintreten würde.

Reagentien:

I. 2,5 Dimethylbenzolsulfonsäure 0,05 m in Essigsäure

II. Digitonin-Cholesterin-Standard 200 mg % bezogen auf Cholesterin
Digitonin crist. p.a. 888,0 mg
Cholesterin p.a. 200,0 mg
in Eisessig 80 ml unter Erwärmen gelöst

III. Digitonin-Isopropylalkohol 0,25 %ig

IV. Isopropylalkohol anhydr.

V. H_2SO_4 conc. p.a.

Durchführung:

Es werden angesetzt:
Analyse, Serumleerwert, Standard-, Reagentienleerwert.

Analyse:		Serumleerwert:	
Digitoninisopropanol (III)	1,0 ml	Isopropanol (IV)	1,0 ml
Serum	0,05 ml		0,05 ml

Nach 10 Minuten scharfem Abzentrifugieren wird der Überstand verworfen.

Analyse:		Serumleerwert:	
Rückstand, feucht	+	Rückstand, feucht	+
Dimeth.benz.sulfs.(I)	2,5 ml		2,5 ml

Standard:		Reagentienleerwert:	
Digitoninstandard (II)	0,05 ml	Digit.Isoprop.(III)	0,05 ml
Dimeth.bonz.sulfs. (I)	2,5 ml		2,5 ml

Nach Aufnahme des Rückstandes und gründlichem Vermischen wird erneut scharf zentrifugiert, Der Überstand möglichst quantitativ in trockene Reagenzgläser überführt. Zur Cholesterinbestimmung dann in alle 4 Testansätze Zugabe von:

H_2SO_4 conc. (V) je 0,5 ml

Nach frühestens 15 Minuten wird am Photometer Eppendorf bei 578 mμ gegen den Reagentienleerwert die Extinktion gemessen.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion}_{\text{Analyse}} - \text{Extinktion}_{\text{Ser.Leerw.}}}{\text{Extinktion}_{\text{Standard}}}$$

. 200 = mg % freies Cholesterin

Das Digitonin-Cholesterin-Standard (II) entspricht 200 mg % Cholesterin.

Berechnung des Cholesterin-Ester

Gesamtcholesterin - freies Cholesterin = Ester-Cholesterin

Diese Berechnung ist hier möglich, da beide Bestimmungen von Gesamt- und freiem Cholesterin mit ein und derselben Bestimmungsmethode durchgeführt und damit direkt vergleichbar sind.

Bestimmung des Lipoidphosphors

Prinzip:

Lipoidphosphor wird nach Bloor (9) mit Aethyläther (3:1)direkt unter Eiweißfällung aus dem Serum extrahiert, der Phosphor zur Bestimmung durch saure Veraschung mit H_2SO_4 und H_2O_2 zu Phosphorsäure oxydiert. Die Phosphorsäure bildet mit dem Ammoniumsalz der Molybdänsäure komplexes Phosphorammoniummolybdat, das durch Aminonaphtolsulfonsäure zu Molybdänblau oxydiert wird. Dieses Gemisch von Molybdänoxyden ist quantitativ kolorimetrisch erfaßbar (Fiske-Subbarow, Teorell (28,102). Hier wurde die Modifikation von Eggstein (26) benutzt.

Reagentien:

I. Aethanoläther (3:1)
   Aethanol p.a. 3 Vol. Teile
   Diaethyläther wasserfrei p.a. 1 Vol. Teil

II. H_2SO_4 conc. p.a. D_{20} = 1,84 - 1,83

III. H_2O_2, Perhydrogen (Perhydrol p.a. 30 Gew.% Fa. Merck)

IV. Ammoniummolybdat 0,6 %ig
   Lösung 6 %-ig 10 ml
   Stammlösung 6 %-ig = Ammoniummolybdat
   $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$. 4 H_2O Fa. Merck 6,36 g/100 ml
   Aqua bidest ad 100,0 ml

V. Aminonaphtolsulfonsäure = Reduktionslösung
   Amino-2-naphtol-4-Sulfonsäure entwässert p.a. 0,5 g
   Na-pyrosulfit $Na_2S_2O_5$ 27,4 g
   Aqua bidest ad 200,0 ml = 15%ig 195,0 ml
   Na-Sulfit Na_2SO_3 . 7 H_2O p.a.crist. 4,0 g
   Aqua bidest ad 10,0 ml = 20%ig 5,0 ml

Zur vollständigen Lösung unter ständigem Schütteln wird weiter Na-Sulfit-lösung 20 %ig dazugegeben, 24 Stunden stehen lassen, filtriert und gegebenenfalls mit Aqua bidest. auf 200,0 ml wieder aufgefüllt.

VI. Eichlösung : 0,5 ml = 5 Gamma Phosphor

Stammlösung 20 %ig	(VII)	5,0 ml
Aqua bidest.	ad	50,0 ml

VII. Stammlösung 20 %ig :

KH_2PO_4 p.a.	87,74 mg
oder	
Dinatriumphenylphosphat p.a. (Riedel-de-Haen) in Trockenpistole getrocknet	140,8 mg
oder	
Dinatriumphenylphosphat $+2H_2O$	164,1mg
Aqua bidest	ad 100,o ml

Durchführung :

1. Extraktion: In einen 25 ml-Erlenmeyerkolben werden gegeben :
   Aethanoläther (3:1) (I) 6,0 ml dazu tropfenweise
   Serum 0,5 ml
   1/2 - 1 Minute im Wasserbad (80°C)aufbewahrt, dann heiß filtriert (Selecta-Filter) in 10 ml-Meßzylinder unter Nachspülen von Kolben und Filter mit Aethanoläther. Nach Abkühlen wird der Meßzylinder auf 10 ml aufgefüllt.
1. Veraschung :In je einem Langhalsveraschungskolben werden Angesetzt :

Analyse:	Testwert:	Leerwert:
Extrakt 2,0 ml	Eichlsg. (VI) 2,0 ml	Aethanoläther (I) 2,0 ml

Das Lösungsmittel wird mittels Druckluft im Wasserbad bis zur Trockene eingedampft.

Der Rückstand wird mit 0,3 ml H_2SO_4 conc. (II) aufgenommen und bei offener Flamme bis zur Schwärze verascht. Nach Abkühlen zugabe von H_2O_2 (III) 0,5 ml und erneutes Erhitzen bis das Perhydrol vollständig entfernt ist.

3. Farbreaktion : Nach Abkühlen zugabe von:
   Ammoniummolybdat 0,6 %ig (IV) je 10,0 ml
   Aminonaphtolsulfonsäure (V) je 0,5 ml
   Genau 30 Min. Aufbewahrung im Dunkeln zur Farbentwicklung .
4. Kolorimetrie :
   Die Extinktion von Analyse, Testwert, und Leerwert werden bei 1cm Schichtdicke am Spektralphotometer bei 720 mu gegen Wasser gemessen.

Berechnung :

$$\frac{\text{Testwert in mg \%}}{E_{\text{Testw.}} - E_{\text{Leerw.}}} = \text{Photometr. Faktor}$$

$$E_{\text{Analyse}} - E_{\text{Leerwert}} \cdot \text{Faktor} = \text{mg \% Lipoidphosphor}$$

Definition der Phospholipide : Es wird darunter der aethanolätherlösliche Phosphor verstanden ( ). Damit erübrigen sich Diskussionen ( ) über Verfälschung durch säurelöslichen Phosphor ( ) und über nochmaliges Umlösen in Benzol oder ähnliches.

Berechnung der Phosphatide

Die Phosphatide (mittleres MG 780) werden üblicherweise aus dem Lipoidphosphor (mittleres MG 31) mit dem Faktor 25 errechnet :

Lipoidphosphor · 25 = Phosphatide

Bestimmung der Gesamtveresterten Fettsäuren

Prinzip:

Die Fettsäureester werden mit Isopropanol aus dem Serum extrahiert (Leffler (70), und mit alkoholischer Hydroxylaminlösung quantitativ in Hydroxymsäuren übergeführt, (Rosenthal (87) und Galetti (31). Die Eisensalze der Hydroxamsäuren werden äquivalent der Esterbindungen bei 5oo - 54o mμ kolorimetrisch erfaßt. Die verwendete Modifikation von Fried und Hoeflmayr (29) vermeidet den Nachteil der nichthaltbaren alkoholischen Hydroxylaminlösung und der alkoholischen NaOH-Lösung durch Verwendung der stabilen Hydroxylaminhydrochloridlösung, wodurch erst während der Analyse die Hydroxylaminbase freigesetzt wird.

Reagentien:

I. Hydroxylaminhydrochloridlösung (11%ig in Methanol) *)

II. Eisen-(III)-chloridlösung 10%ig in o,1 n.HCL

III. Trioleinstandard 5o mg% in Isopropanol *)

IV. NaOH 10%ig

NaOH p.a.	1o,o g
Aqua bidest.ad	1oo,o ml

V. HCl 3,8 n.

HCl conc.p.a.	38,o ml
Aqua bidest.ad	1oo,o ml

VI. Isopropanol DAB 6

VII. Diaethyläther p.a. (Fa.Merck)

*) als fertige Lösung im Handel bei Fa. Dr. H. Haury München.

Durchführung:

Es werden Analyse, Standard und Leerwert angesetzt:

Analyse: Isopropanol (VI) 1,9 ml
Serum 0,1 ml

Nach lo-minütigem Stehen wird scharf abzentifugiert und zugegeben:

	Analyse:	Standard:	Leerwert:
NaOH lo%ig (IV)	o,5 ml	o,5 ml	o,5 ml
Hydroxylaminhydrochl. (I)	o,5 ml	o,5 ml	o,5 ml
Zentrifugat	1,o ml	Standard (III) 1,o ml	Isopropanol (VI) 1,o ml

Erneut wird, nach gutem Mischen, der Ansatz bei Zimmertemperatur 3o Min. aufbewahrt. Dann:

	Analyse:	Standard:	Leerwert:
HCl 3,8 n.(V)	o,5 ml	0,5 ml	o,5 ml
Eisen-(III)-chl. lo%ig (II)	o,5 ml	o,5 ml	o,5 ml
Diaethyläther (VII)	o,5 ml	o,5 ml	o,5 ml

Nach 2o Min. wird am Photometer Eppendorf die Extinktion gegen den Leerwert gemessen, bei 52o mμ.

Bereichnung:

$$\frac{\text{Extinkt. Analyse}}{\text{Extinkt. Standard}} \times \text{looo} = \text{mg\% Gesamtveresterte Fettsäuren.}$$

Bestimmung der nichtveresterten Fettsäuren (FFS)

(= Freie Fettsäuren)

Prinzip:

Die Nichtveresterten Fettsäuren werden durch Kupfernitrat-Triaethanolamin-Reagens in Kupfersalze überführt (Ayers (2) und Iwayama (57). Diese sind in Chloroform löslich und werden nach Bildung von Farbkom-plexen mit Na-diaethyldithiocarbamat kolorimetrisch bestimmt (Duncombe (22) und Howorth (56).

Reagentien:

I. Kupfer-Reagenz: 150 ml *)
Triaethanolamin 1 m 9 Vol.Teile
Essigsäure 1 N 1 Vol.Teil
$Cu(NO_3)_2$, 3 H_2O (W/V) p.analyse 10 Vol.Teile

II. Standardlösung 100 ml *)
Palmitinsäure p.a. 1 m Val/l
in Chloroform p.a.

III. Butylalkohol: *)
Butan - 2 - ol redest.p.a. 100 ml

IV. Thiocarbamat - Reagenz: *)
Na - diaethylthiocarbamat o,1% (W/V)
in Butan-2-ol redest.

V. Chloroform p.a. *)

*) Als fertige Lösung im Handel bei Fa. Dr. H. Haury, München.

Durchführung:

In chloroformunlöslich verschliessbaren Zentrifugengläsern werden Analyse, Standard- und Leerwert angesetzt.

	Analyse:	Standard:	Leerwert:
Serum	0,2 ml		
Chloroform (III)	3,o ml	Standard (II) 2,o ml	Chloroform (IV) 3,o ml
Kupfernitrat-Triaethanolamin (I)	1,o ml	1,o ml	1,o ml

Nach kräftigem Schütteln in verschlossenen Gefäßen wird scharf abzentrifugiert. Der Überstand wässrig grüner Kupfersalze und die darunterliegende Schicht ausgefallenen Eiweisses werden vorsichtig abgenommen, der Chloroformrückstand wird verwertet.

In alle drei Ansätze für Analyse, Standard- und Leerwert werden gegeben:

Chloroformrückstand	je 1,5 ml
Thiocarbamatreagens (III)	je o,5 ml

Nach 15 Min. wird am Photometer Eppendorf bei 52o mμ gegen den Leerwert gemessen.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinkt. Analyse}}{\text{Extinkt. Standard}} = \text{mval/l Nichtveresterte Fettsäuren (NEF)}$$

*) Als fertige Lösung im Handel bei Fa. Dr. H. Haury, München.

Bestimmung der Glucose:

Enzymatische Bestimmung nach Bergmeyer und Bernt ( ).

Glucose wird durch das spezifische Enzym Glucoseoxidase zu Gluconolacton oxydiert, das in wässriger Lösung in Gluconsäure übergeht. Glucoseoxidase (GOD) katalysiert die Reaktion:

$$\text{D-Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{D-Gluconsäure} + H_2O_2$$

Indikatorreaktion:

Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxyd dehydriert in Gegenwart von Peroxidase (POD) o-Dianisidin unter Bildung eines rotbraunen Farbstoffes:

$$H_2O_2 + \text{O-Dianisidin } H_2 \xrightarrow{POD} \text{O-Dianisidin} + H_2O$$

Die Intensität des Farbstoffes ist proportional der Glucosekonzentration und wurde bei einer Wellenlänge von 436 mμ im Photometer Eppendorf gemessen. Die Methode gilt als spezifisch. Normalwerte 60 - 90 mg/100 ml Nüchternblut.

Reagentien:

I. Enzym-Lösung *)
Peroxydase 40 μg/ml
Glucoseoxydase 250 μg/ml in Phosphatpuffer 0,10 M p H = 7,o

II. Chromogen-Lösung *)
O-Dianisidinhydrochlorid 6,6 mg/ml in 2 ml Aqua bidest

III. Standard-Lösung *)
Glucose 91 μg/ml

IV. Glucose - Reagenz: *)

Chromogen-Lösung (II)	100 Vol.Teile
Enzym-Lösung (I)	1 Vol.Teil

Vor Gebrauch auf 20°C gebracht.

V. Uranylacetat - Lösung:

Uranylacetat	p.a.	160 mg
Na Cl	p.a.	900 mg
Aqua bidest	ad	100 ml

Durchführung:

Enteiweißung: In 10 ml-Zentrifugenglas wir pipettiert:

Uranylacetat-Lösung (V)	1,0 ml
Blut	0,1 ml

Pipette gut spülen. Zentrifugieren.

Testansatz:

In Reagenzgläser werden gegeben:

	Leerwert	Standard	Analyse
Aqua bidest	0,2 ml		
Glucose-Standard (III)		0,2 ml	
Überstand nach Enteiweißung			0,2 ml
Glucose-Reagenz (IV)	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml

35-Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen (ohne Sonneneinstrahlung).
Dann Extinktion im Photometer bei 436 mu gegen Leerwert messen.

Berechnung

$$\frac{E_{\text{Analyse}}}{E_{\text{Standard}}} + 100 \cdot = \text{mg\% Glucose}$$

Ergebnisse

Serumglycerinspiegel bei Gesunden - Methodenvergleich

Das Ergebnis der Glycerinspiegelbestimmungen im Serum bei 37 gesunden Versuchspersonen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Werte sind nach der von O. Wieland (114) beschriebenen Methode ermittelt. Ihnen gegenübergestellt ist ein Normalkollektiv von 11 Personen, bei denen Glycerin nach der Methode von Kreutz (66) bestimmt wurde.

Wie man sieht, beträgt die Glycerinkonzentration im Plasma nach der Methode von O. Wieland im Mittelwert 82,21 $\pm$ 20,66 µMol/l. Dies entspricht 0,76 $\pm$ 0,18 mg%.

Nach der Methode von Kreutz findet sich bei den 11 von uns untersuchten 18-jährigen gesunden Versuchspersonen im Blutserum ein Mittelwert von 86,45 $\pm$ 15,20 µMol/l, entsprechend einem Mittelwert von 0,79 $\pm$ 0,14 mg%.

Danach ergibt der Vergleich der beiden Methoden eine Signifikanz $p > 0{,}25$. Der Unterschied ist also statistisch nicht signifikant.

Serumglycerin bei verschiedenen Erkrankungen, bei Schwangerschaft und Streß im Hungerzustand.

Bei Gruppen von je 25 akuten Hepatitiskranken, 13 Lebercirrhotikern, 4 chronischen Nephritiden und 13 Adipösen wurden die in Tabelle 2 zusammengestellten Glycerin-Nüchternwerte gefunden. Demnach liegen bei akuter Hepatitis, Lebercirrhose und Adipositas signifikant erhöhte Serumspiegel vor. Dasselbe scheint auch für chronische Nephritiden zu gelten. Allerdings ist die Zahl der davon untersuchten Fälle gering.

	Methode nach: O. Wieland	Methode nach: Eggstein und Kreutz	Methode nach: O. Wieland	Methode nach: Eggstein und Kreutz
Zahl der Fälle	38	11	38	11
Mittelwert $\bar{x}$	82,21 µ Mol/l	86,45 µ Mol/l	0,76 mg/100 ml	0,79 mg/100 ml
Standardabweichung vom Mittelwert S $\bar{x}$	3,35 µ Mol/l	4,58 µ Mol/l	0,03 mg/100 ml	0,043 mg/100 ml
Standardabweichung S x	20,66 µ Mol/l	15,20 µ Mol/l	0,18 mg/100 ml	0,14 mg/100 ml
Höchster gemessener Wert	115,0 µ Mol/l	114,0 µ Mol/l	1,06 mg/100 ml	1,05 mg/100 ml
Niederster gemessener Wert	41,0 µ Mol/l	60,0 µ Mol/l	0,38 mg/100 ml	0,53 mg/100 ml
Vergleich-Signifikanz	$p > 0,25$			

Serumglycerinspiegel gesunder Versuchspersonen.
Vergleich der Methode von Eggstein und Kreutz mit der Methode von O. Wieland

Tabelle 1

	Zahl der Fälle	Mittelwert $\bar{x} \pm S\bar{x}$ µMol/l	Standard-abweichung Sx µMol/l	Das entspricht in mg% $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Sx	Signifikanz gegenüber Normal
Akute Hepatitis	25	137,16 ± 9,81	49,07	1,27 ± 0,09	0,45	$p < 0,001$
Lebercirrhosen	13	157,53 ± 12,45	44,88	1,45 ± 0,11	0,41	$p < 0,001$
Chronische Nephritis	4	114,5 ± 6,28	12,56	1,05 ± 0,05	0,11	
Adipositas	11	166,39 ± 28,11	93,23	1,53 ± 0,26	0,85	$p < 0,001$
Graviditas	12	127,25 ± 9,11	31,55	1,17 ± 0,08	0,29	$p > 0,001$
Stress im Hungerzustand	9	127,66 ± 13,55	40,65	1,17 ± 0,12	0,37	$p > 0,001$

Nüchternwerte der Glycerinkonzentration bei verschiedenen Erkrankungen, bei Graviditas sowie Stress im Hungerzustand. Gemessen wurde bei den Fällen von Adipositas und Stress im Hungerzustand nach der Methode nach Kreutz, bei allen anderen nach der Methode von O.Wieland.

Tabelle 2

Tabelle 3

Zahl der Fälle	18	18
Mittelwert $\bar{x}$	100,33 µ Mol/l	0,92 mg/100 ml
Standardabweichung vom Mittelwert S $\bar{x}$	10,82 µ Mol/l	0,10 mg/100 ml
Standardabweichung Sx	45,90 µ Mol/l	0,42 mg/100 ml
Höchst.gemess.Wert	183,0 µ Mol/l	1,68 mg/100 ml
Niederst.gemess.Wert	38,0 µ Mol/l	0,35 mg/100 ml

Glycerinspiegel im Harn gesunder Versuchspersonen.

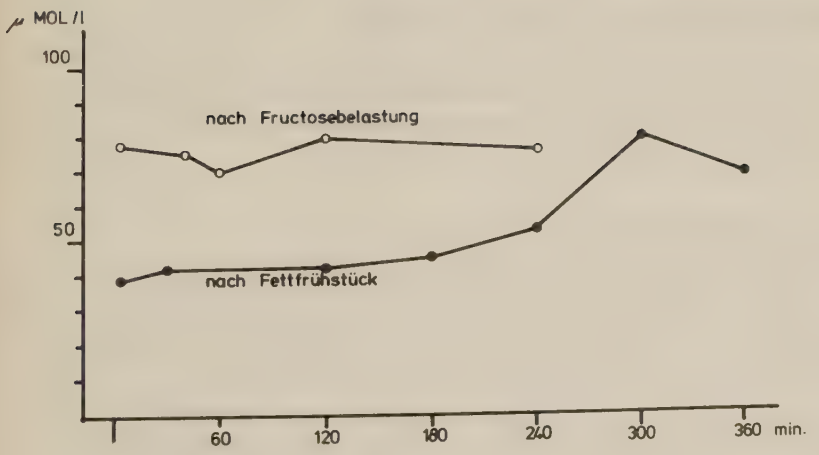


Abb. 3: Serumglycerinspiegel nach Fructósebelastung und nach Fettfrühstück

Wie weiterhin aus Tabelle 2 hervorgeht, ist die Serumglycerinkonzentration in der Schwangerschaft und nach Streß im Hungerzustand ebenfalls erhöht.

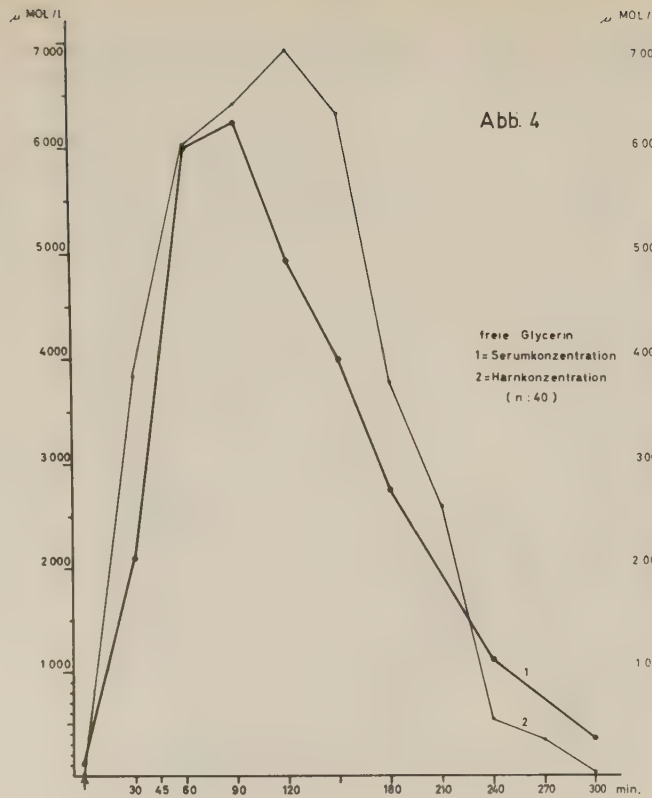
Die Fälle von Streß im Hungerzustand sind einem Zufall zu verdanken. Bei der Einbestellung von Gruppen von Bundeswehrsoldaten, die als Normalpersonen dienen sollten, mußte eine Gruppe von 5 Soldaten morgens um 5 Uhr strafexerzieren und dann um 8.30 Uhr nüchtern bei uns antreten. Eine andere Vierergruppe war in der Nacht zu einem Alarmdienst herangezogen worden, kam erst in den letzten Morgenstunden wieder zu Bett und erschien ebenfalls gegen 8.30 Uhr nüchtern. Da bei diesen Personen signifikant höhere Serumglycerinspiegel vorlagen als bei den anderen gesunden Probanden, wurden diese Werte aus dem Normalkollektiv herausgenommen.

Glycerinkonzentration im Harn Gesunder

Die im Harn gesunder Versuchspersonen ermittelten Glycerinwerte sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Hier ergab sich eine mittlere Glycerinkonzentration von 100,33 $\pm$ 45,9 µMol/l, das entspricht 0,92 $\pm$ 0,42 mg%.

Glycerinserumspiegel nach Fettbelastung

Im Darm werden Nahrungsfette in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Es wurde deshalb geprüft, ob nach oraler Fettbelastung der Glycerinspiegel im Plasma ansteigt. Das Ergebnis eines Selbstversuchs zeigt Abbildung 3.
Die Glycerinwerte haben sich 5 Stunden nach Einnahme der Fettmahlzeit verdoppelt, ohne über den ermittelten Normbereich hinaus anzusteigen. Auch nach der 6. Stunde waren sie noch deutlich höher als der Ausgangswert. Es sei erwähnt, daß das Serum während des gesamten Versuchszeitraums deutlich hyperlipaemisch getrübt war.



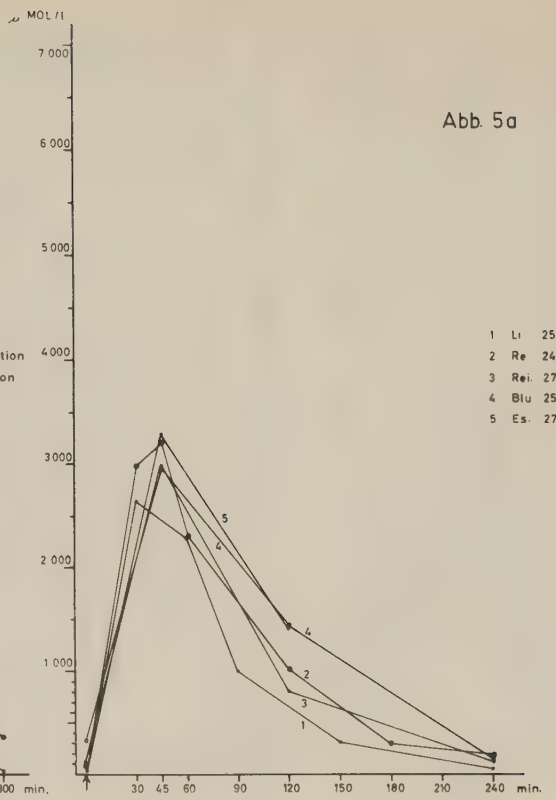


Abb.4 : Glycerinbelastung mit 50 g Glycerin oral

Abb. 5a-c: Glycerinbelastung mit 300 mg/kg oral. Gesunde VP.

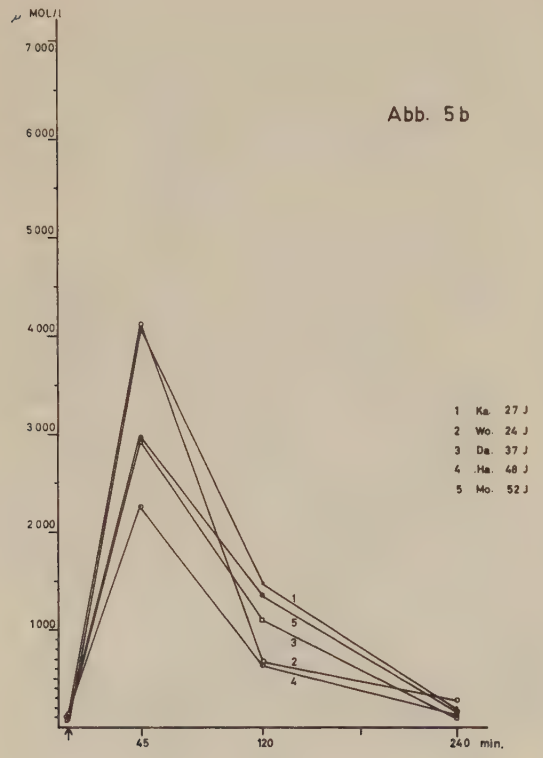

MOL/l
7 000
6 000
5 000
4 000
3 000
2 000
1000
45
120
240 min.
1 Ka. 27 J
2 Wo. 24 J
3 Da. 37 J
4 Ha. 48 J
5 Mo. 52 J

Abb. 5 b

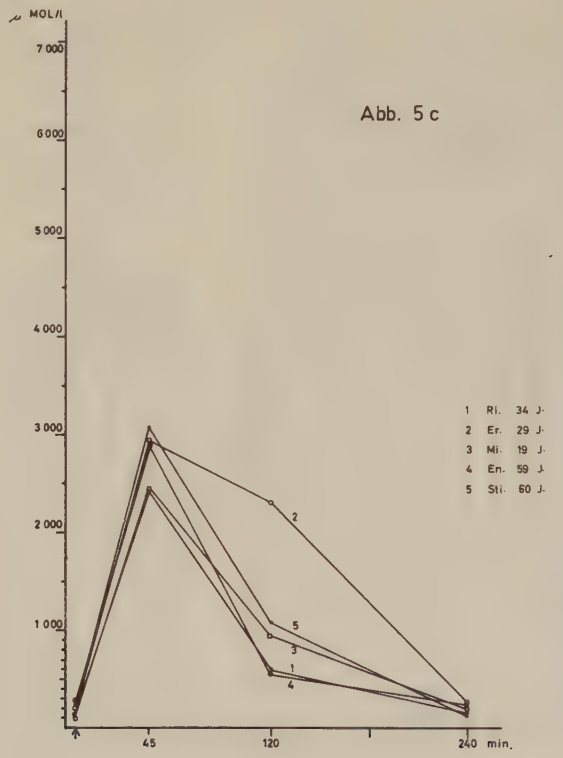

MOL/l
7 000
6 000
5 000
4 000
3 000
2 000
1 000
45
120
240 min.
1 Ri. 34 J.
2 Er. 29 J.
3 Mi. 19 J.
4 En. 59 J.
5 Sti. 60 J.

Abb. 5 c

Glycerinserumspiegel nach Fructosebelastung

Entsprechend dem Schema in Abbildung 1 hängen Glycerin- und Fructosestoffwechsel eng zusammen. Es war deshalb naheliegend zu prüfen, ob Fructosezufuhr auf den Glycerinspiegel einen Einfluß hat. Der Selbstversuch einer Belastung mit 2 g Fructose pro kg Körpersollgewicht, das heißt insgesamt 132 g Fructose oral, ließ jedoch keinerlei Bewegung des Serumglycerinspiegels im Beobachtungszeitraum von 4 Stunden erkennen (Abbildung 3).

Glycerinspiegel in Blut und Harn nach oraler Glycerinbelastung

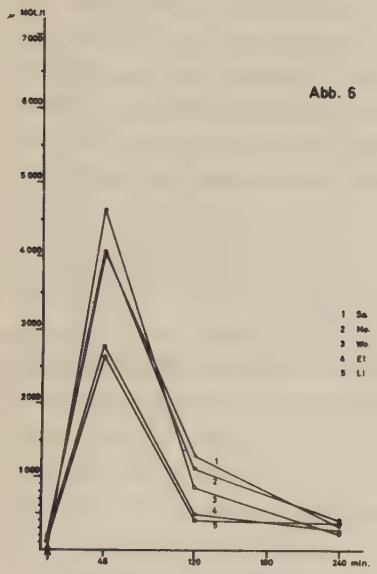
Nach oraler Einnahme von 50 g Glycerin im Selbstversuch, das entspricht 750 mg pro kg Körpersollgewicht, in zwei Portionen im Abstand von 30 Minuten ergab sich ein starker Anstieg des Serumglycerinspiegels auf das etwa 60-fache des Ausgangswertes (Abbildung 4) mit Gipfelpunkten bei 90 Minuten. Der Ausgangswert wurde erst nach 6 Stunden wieder erreicht. Gleichzeitig mit dem Glycerinanstieg im Serum setzte die renale Ausscheidung ein, die über die Dauer der Versuchsperiode dem Glycerinspiegel parallel verläuft.

Geht man von der höchsten Serumkonzentration aus und nimmt man ein Gesamtplasmavolumen von 2,8 l an, so finden sich also nur insgesamt etwa 1,6 g Glycerin nach 90 Minuten im Plasma wieder. Im gleichen Zeitraum werden renal 2,9 g Glycerin ausgeschieden. Die restlichen 45,5 g der zugeführten Glycerinmenge müssen somit, vollständige Resorption im Magen-Darmtrakt vorausgesetzt, zu diesem Zeitpunkt entweder im extravasalen Raum verteilt oder metabolisiert worden sein. Nach 6 Stunden betrug die gesamte Ausscheidung 4,9 g und der Plasmaspiegel war wieder normalisiert. Das bedeutet, daß insgesamt 90 % der zugeführten Glycerinmenge utilisiert worden sind.

Nach diesem orientierenden Selbstversuch wurden 13 gesunde Versuchspersonen einer oralen Belastung von 300 mg Glycerin pro kg Körpersollgewicht unterzogen, das entspricht 20 - 25 g pro Person. Die Dosis wurde geringer gewählt, um eine möglichst vollständige Utilisation zu gewährleisten.
Tatsächlich lagen die renalen Ausscheidungsquoten in diesen Versuchen nur zwischen 3 und 6 % der zugeführten Glycerinmenge. Im übrigen ähneln die Verlaufskurven des Glycerinspiegels der schon aus Abbildung 4 bekannten Form, jedoch war der Gesamtanstieg geringer, der Gipfelpunkt lag früher und erreichte nur das 20 - 30-fache des Ausgangswertes (Abbildung 5 a - c). Es fallen zwei Kurven mit deutlich höheren Gipfelpunkten auf. Bei dem einen Fall handelt es sich um eine klinisch gesunde Studentin mit ausgeprägter Adipositas. Im zweiten Fall handelte es sich um einen 27-jährigen Kollegen, einem kräftigen, sportlichen Mann, der 5 Wochen nach diesem Glycerintest mit einer schweren Hepatitis epidemica in der Universitätsklinik stationär aufgenommen wurde. Es erscheint möglich, daß die abnorme Verlaufskurve des Serumglycerins mit einer bereits zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Leberschädigung in Zusammenhang stand.

Glycerinbelastung bei akuter Hepatitis

Um diese Frage weiter zu verfolgen, wurden 5 akute Hepatisiskranke mit gleicher Technik untersucht. Wie Abbildung 6 zeigt, fanden sich bei 3 dieser Patienten ebenfalls Kurven mit einem Anstieg des Serumglycerins auf das 40-fache des Ausgangswertes, während sich die restlichen 2 nicht deutlich von den Normalfällen unterschieden (Abbildung 6). Von den Fällen mit höherem Anstieg des Glycerinspiegels befanden sich Fall 1 und Fall 3 in der zweiten Woche der stationären Hepatitisbehandlung, während die beiden Fälle mit geringerem



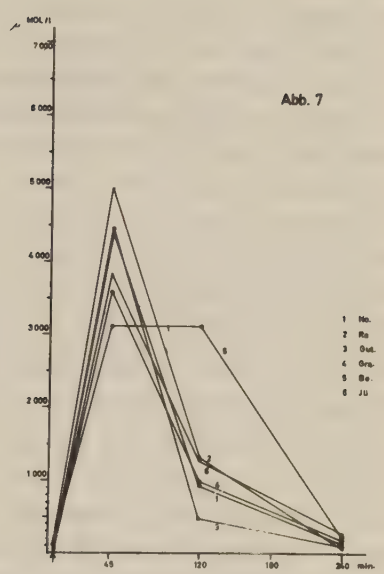


Abb. 6 Glycerinbelastungen mit 300 mg/kg Körpersollgewicht bei 5 Fällen von akuter Hepatitis.

Abb. 7 Glycerinbelastungen mit 300 mg/kg Körpersollgewicht bei 6 Fällen von anderen Lebererkrankungen (Siehe Seite 43).

Anstieg Nr. 4 und Nr. 5 sich in der 5. bzw. am Ende der 4. Behandlungswoche befanden und die Hepatitis bereits im Abklingen war. Fall 2 war nicht mehr sicher zu bestimmen, da bei der Auswertung der Befunde das Krankenblatt in der Klinik nicht aufgefunden werden konnte. Danach kann vermutet werden, daß der höhere Anstieg des Serumglycerinspiegels nach Glycerinbelastung bei Fällen von akuter Hepatitis während der floriden Phase der Krankheit gefunden wird, während sich zum Zeitpunkt des Abklingens der Hepatitis die Belastungskurve der von gesunden Versuchspersonen wieder annähert.

Weitere Glycerinbelastungen mit auffallendem Verhalten der Serumglycerinverlaufskurven bei anderweitigen Lebererkrankungen zeigt Abbildung 7.

Es handelt sich bei
Fall 1 um eine Fettcirrhose bei Adipositas,
Fall 2 um einen Verschlußikterus bei Cholelithiasis,
Fall 3 um eine Hepatitis mit chlolostatischem Einschlag,
Fall 4 um eine Lebercirrhose mit Ascites,
Fall 5 um einen chronischen Leberparenchymschaden bei allgemeiner Gefäß- und Cerebralsklerose,
Fall 6 um eine kleinknotige Lebercirrhose.

Zusätzliche Bestimmungen weiterer Metabolite nach Glycerinbelastung

Für weitere Untersuchungen war es von Interesse, in einer Testserie das Verhalten des Plasmaglycerins nach Belastung in kürzeren Zeitabständen zu verfolgen und gleichzeitig weitere Metabolite des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels mitzubestimmen.
Mangels eines Kollektivs von gesunden Kontrollpersonen wurde wiederum ein Selbstversuch durchgeführt mit einer oralen Glycerinbelastung von 200 mg/kg Körpersollgewicht

und Bestimmung der Werte nach 10, 20, 40, 60, 120 und 180 Minuten. Es ergab sich ein Anstieg des Serumglycerins mit Gipfelpunkt bei 40 Minuten auf 2000 µ Mol/l, das heißt auf das etwa 20-fache des Ausgangswertes. In den Serumspiegeln von Triglyceriden, freiem und Ester-Cholesterin, Phosphatiden und freien Fettsäuren (FFS) fand keine nennenswerte Bewegung statt.

Bei 5 von 7 Fällen von Lebercirrhose, die unter denselben Bedingungen Glycerin einnahmen, lag der Gipfelpunkt der Serumglycerinkurve bei 20 Minuten, wobei viermal Werte von etwa 2000 µ Mol/l (siehe Abbildung 8 a) einmal von fast 5000 µ Mol/l erreicht wurden. Bei den beiden anderen dieser Fälle ergab sich mit verzögertem Gipfel bei 60 Minuten ein auffallend niedriger Glycerinanstieg nur bis etwa 1000 µ Mol/l. Von den mitbestimmten Metaboliten reagierten hier in 3 der 7 Fälle die FFS mit initialem Anstieg und Normalisierung (Abbildung 8 a) bzw. leichter Erniedrigung nach 1 - 2 Stunden.

Bei einem Patienten mit chronischer Hepatitis und intrahepatischer Cholostase, der einen erhöhten Glycerin-Nüchternwert von 650 µ Mol/l aufwies, fand sich nach oraler Belastung überhaupt kein Anstieg des Serumglycerinspiegels. In diesem Fall reagierten aber deutlich die Triglyceride und auch synchron die FFS mit Anstieg und Gipfelpunkten nach 40 Minuten. Ein bezüglich der Triglyceride ähnliches Verhalten findet sich später bei den intravenösen Glycerinbelastungsproben besonders der unter der Gruppe IX zusammengefassten Patienten (siehe Seite 60). Bei einer adipösen Patientin mit Hypertonus fiel ebenfalls ein nur geringer Anstieg des freien Glycerins von 200 auf 650 µ Mol/l auf, Hier zeigte sich ein rascher und deutlicher Anstieg der Triglyceride um etwa 2200 µ Mol/l bei gleichzeitigem Absinken der Cholesterin-Ester um etwa

1000 µ Mol/l. Beide Metabolite erreichten nach 1 - 2 Stunden wieder den Ausgangswert.
Ein Patient mit diabetischer Fettleber zeigte trotz Glycerinanstieg auf 2000 µ Mol/l gleichzeitig deutlichen Anstieg der Triglyceride und Abfall der Cholesterin-Ester. Hier war auch die Glukose mitbestimmt worden, die im Zeitraum von 3 Stunden insgesamt um 7000 µ Mol/l anstieg. Dieses Verhalten korrespondiert wieder mit Gruppe VII der späteren intravenösen Belastungen (siehe Seite 60).

Intravenöse Glycerinbelastung

Um die allen oralen Belastungsproben anhaftenden Unsicherheiten hinsichtlich der Resorption auszuschalten, wurden Untersuchungen nach intravenöser Glyceringabe durchgeführt. Das unterschiedliche Verhalten des Plasmaglycerins nach oraler im Gegensatz zu intravenöser Glycerinbelastung bei derselben Patientin ist in Abbildung 8 dargestellt.
Wie zu erwarten, kommt es nach intravenöser Gabe zu einem wesentlich rascheren Anstieg der Serumglycerinkonzentration als nach oraler Verabreichung. Wie später gezeigt wird, liegt der initiale Gipfel bei Gesunden und den meisten pathologischen Fällen sogar noch unter der 1-Minutengrenze. Der verzögerte Anstieg nach oraler Gabe kann durch den limitierenden Schritt der Resorption erklärt werden.

Dosierung der Glycerinbelastung

Nach einer Serie von Vorversuchen mit intravenöser Glycerinbelastung in verschiedener Konzentration, ergab sich als zweckmäßigste Dosis für die intravenöse Belastung eine Menge von 75 mg Glycerin pro kg Körpersollgewicht. Hierbei zeigen sich einerseits schon genügend ausgeprägte Bewegungen in den Serumspiegeln der meisten mituntersuchten Metabolite, andererseits liegt die Glycerinbelastung in einem Bereich wo die Ausscheidung nicht metabolisierten Glycerins im Harn noch nicht besonders ins Gewicht fällt.

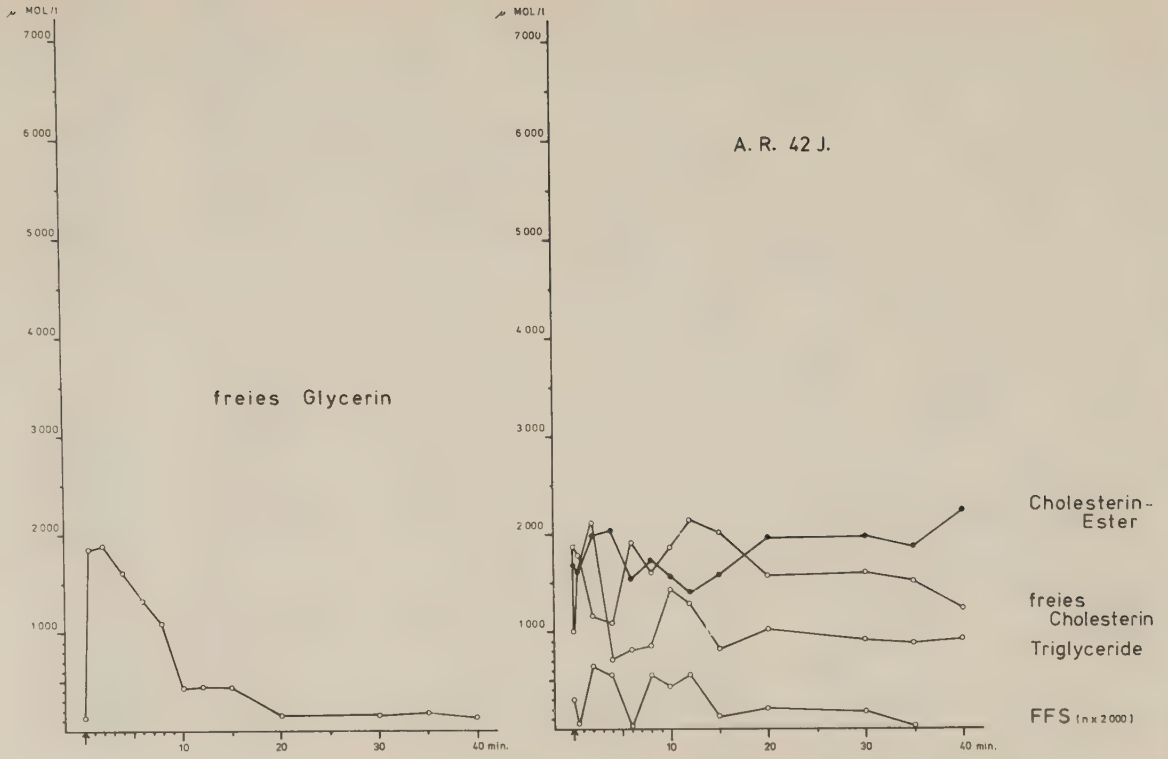


Abb.8a : Atrophische Lebercirrhose. 200 mg/kg Glycerin oral.

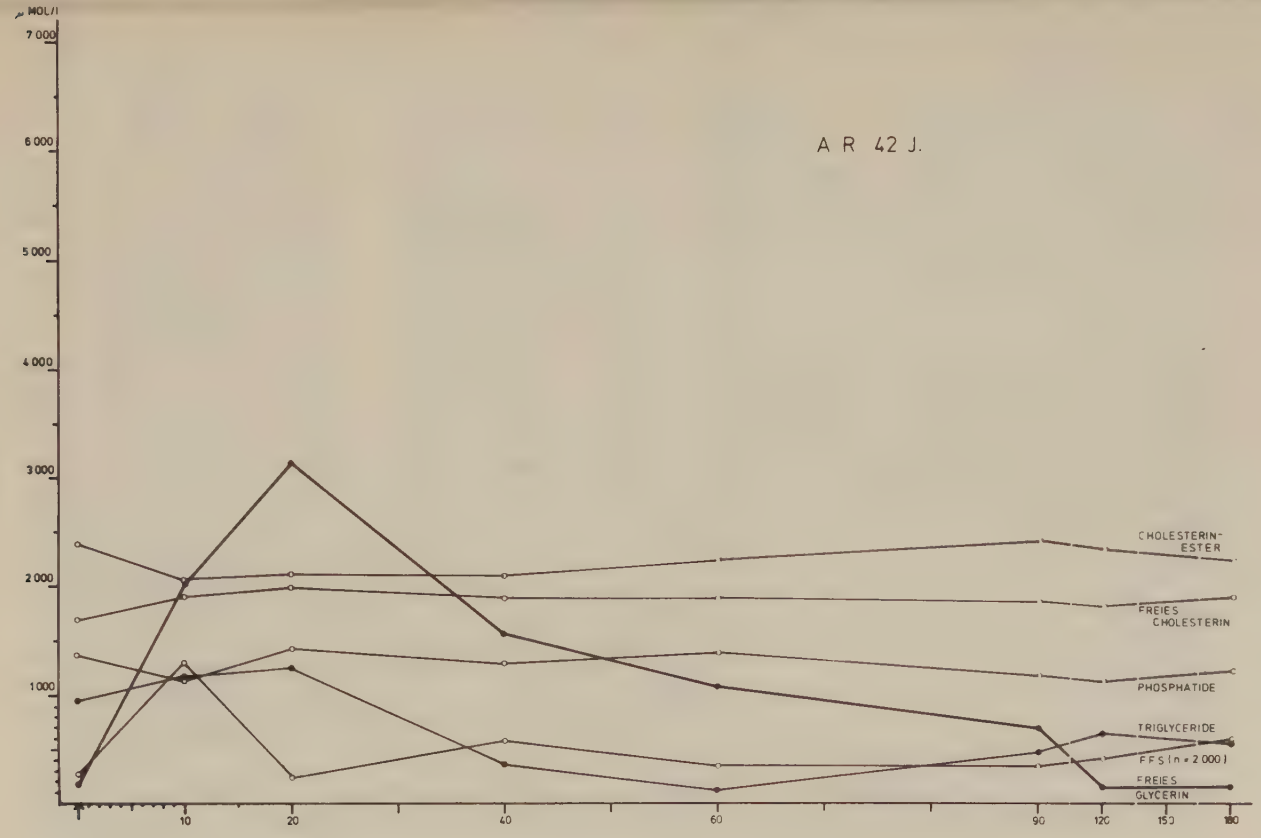


Abb.8b : Dieselbe Patientin wie oben mit 50 mg/kg Glycerin i.v.

Intravenöse Glycerinbelastung an 17 gesunden und 15 kranken Versuchspersonen

Die Bestimmung der Serumglycerinspiegel nach intravenöser Belastung mit Glycerin, 75 mg/kg Körpersollgewicht, bei 17 gesunden und 15 kranken Versuchspersonen ließ zunächst kein für die Normalfälle bzw. für bestimmte Krankheitsgruppen gleichsinniges Verhalten erkennen.
Erst die zunächst lediglich nach optisch ähnlichen Serumspiegelkurven des freien Glycerins durchgeführte Ordnung in 10 Gruppen ohne Rücksicht auf Zugehörigkeit der Probanden zum Normal- bzw. pathologischen Kollektiv ließ dann auch gewisse typische Abweichungen in den Serumspiegeln der anderen Metabolite erkennen.
Es konnten nun 4 verschiedene Reaktionsgruppen bei Belastungen gesunder Versuchspersonen unterschieden werden sowie 5 weitere, die sich auf die Kollektive kranker Versuchspersonen verteilen. Lediglich in Gruppe II findet sich neben 4 gesunden Versuchspersonen auch ein Fall mit Adipositas, Lebersteatose und diabetischer Stoffwechsellage.
Die Abbildungen 10 - 19 stellen diese 10 Gruppen in jeweils 2 Abbildungen vor. Die erste Abbildung zeigt jeweils die Mittelwertkurven für Serumglycerin und für die anderen gemessenen Metabolite der jeweiligen Gruppe mit Maxima- und Minimaparametern isoliert dargestellt.

Die Parameter beschreiben dabei in der Vertikalen die Spanne der verschiedenen Serumkonzentrationen, in der Horizontalen die Spanne der Zeitpunkte, in welche die Kurvenmaxima bzw. -minima der jeweiligen Gruppe zu liegen kommen.

Die zweite Abbildung stellt demgegenüber je einen typischen Vertreter der Gruppe in Kurven gemessener Originalwerte dar.

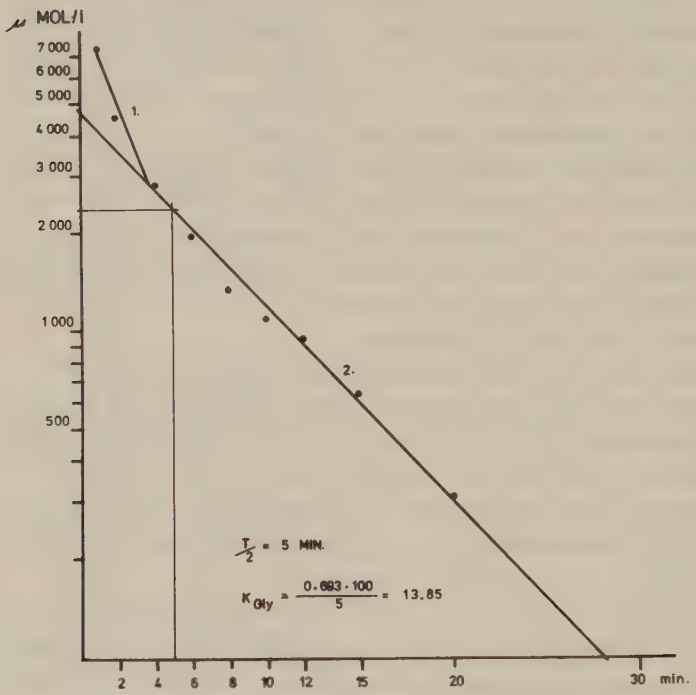


Abb. 9: Eliminationskoeffizient K_{Gly}
am Beispiel von Reaktionstyp II. Man erkennt deutlich 2 Eliminationsgeschwindigkeiten eine erste (1) von der 1. - 4. Minute und die Hauptelimination (2) von der 4. - 20. Minute.
Hieraus ergibt sich K_{Gly} = 13.85

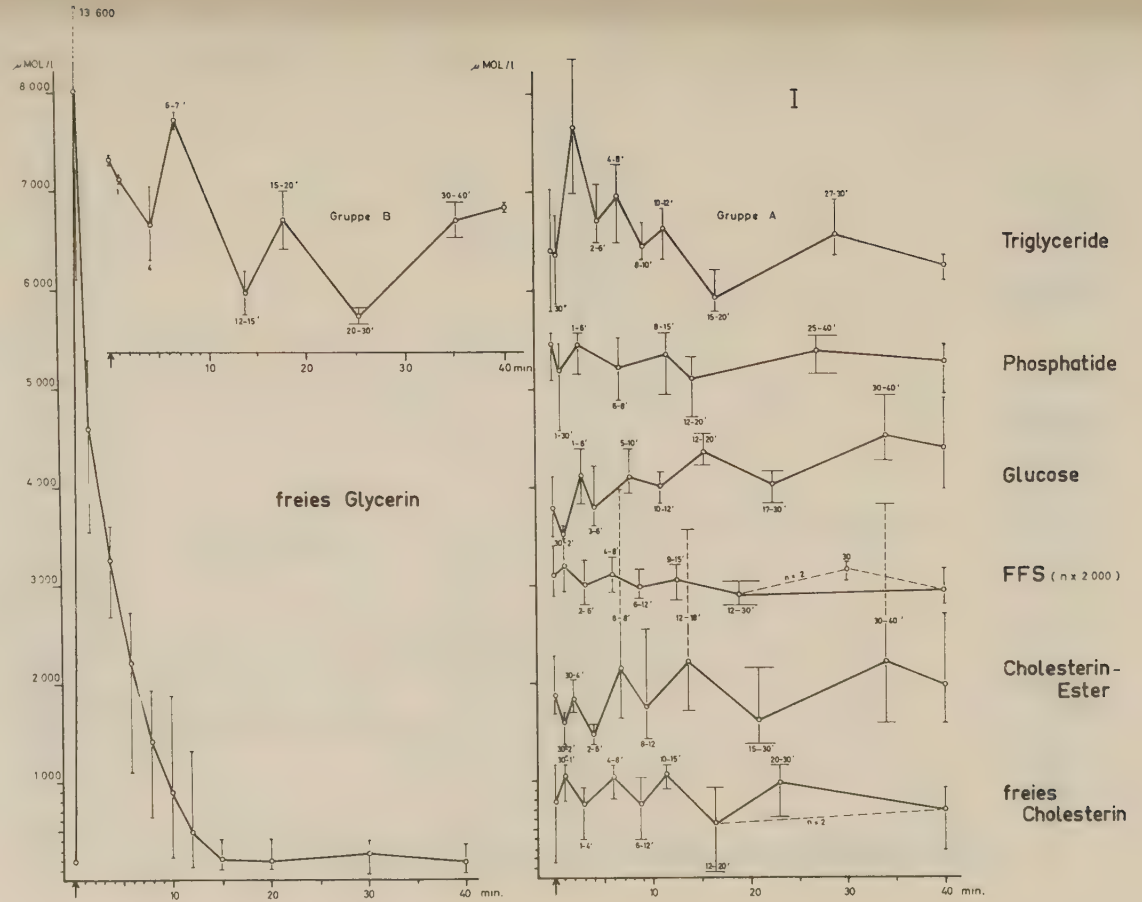


Abb.10a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs I

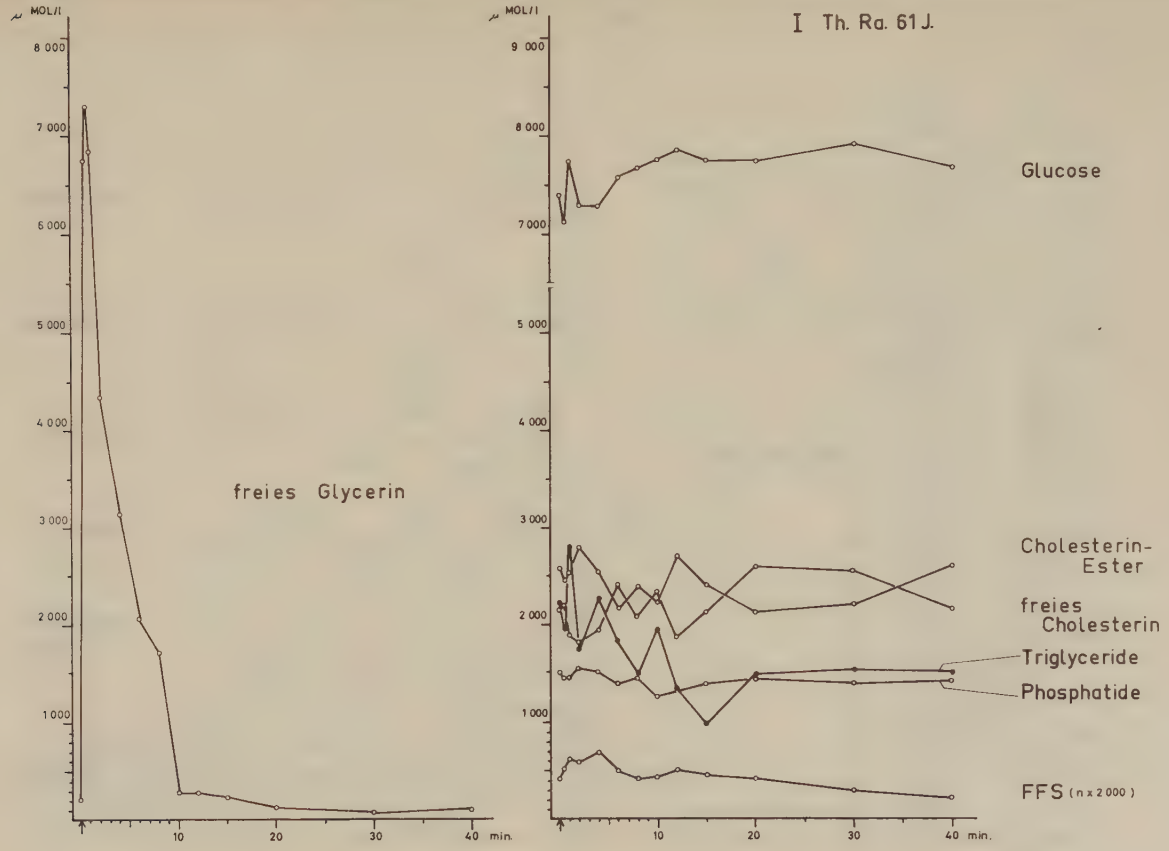


Abb.10b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

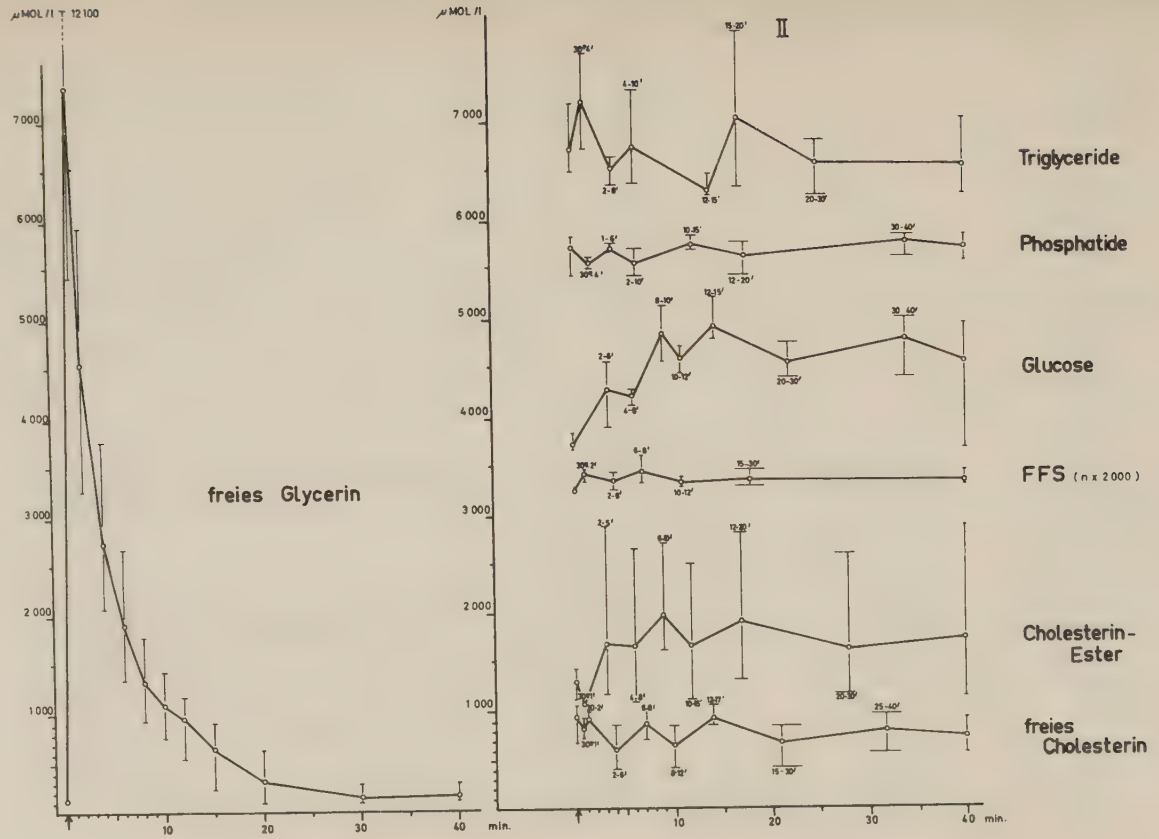


Abb.11a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs II

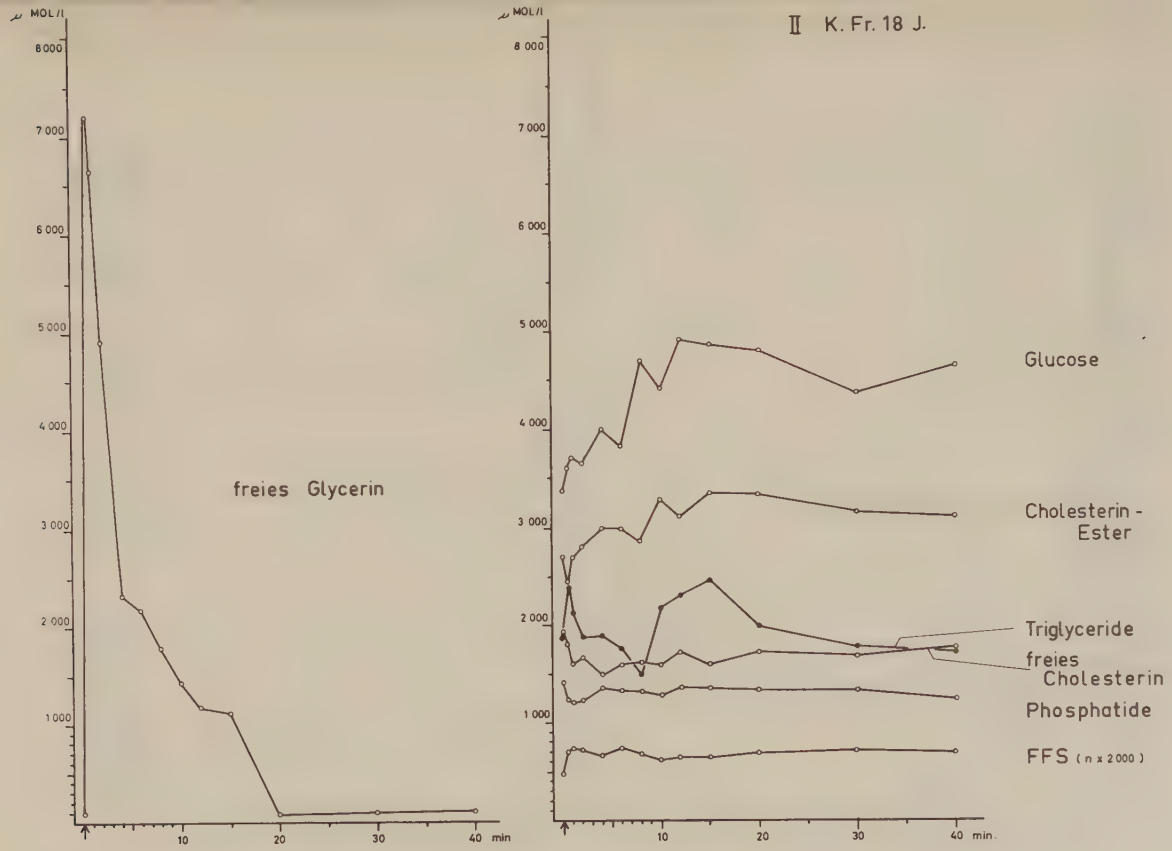


Abb.11b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

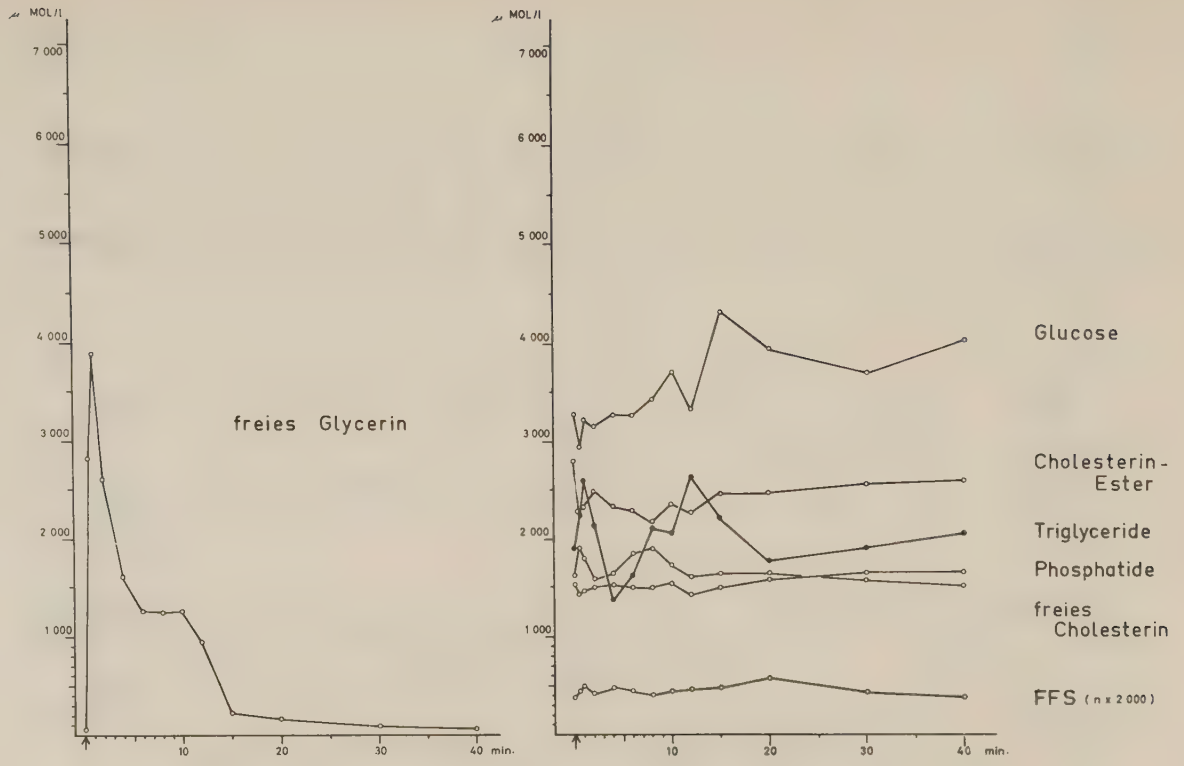


Abb.12a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs III

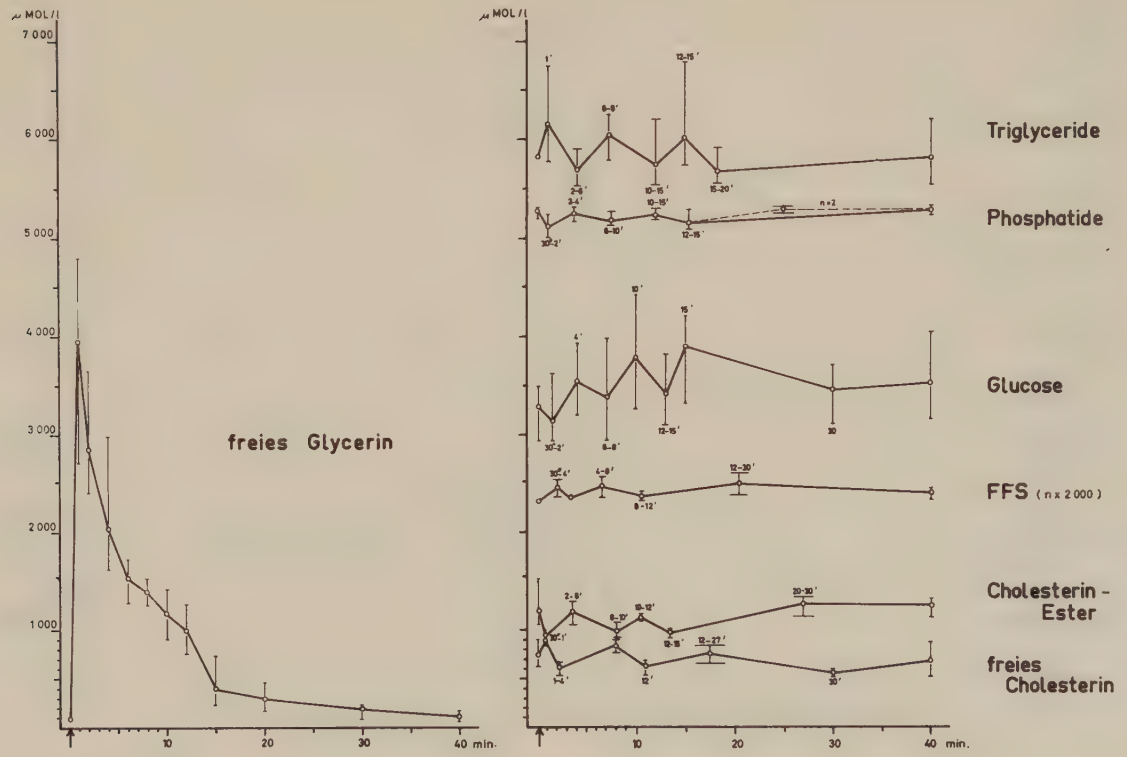


Abb.12b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

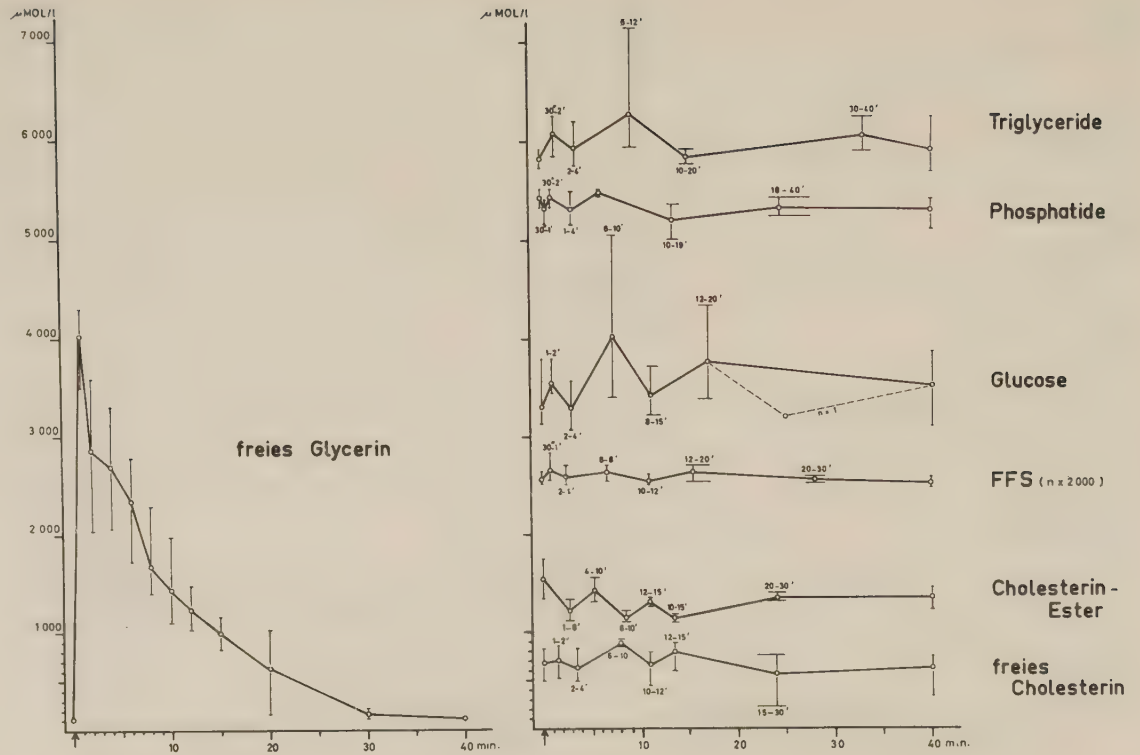


Abb.13a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs IV

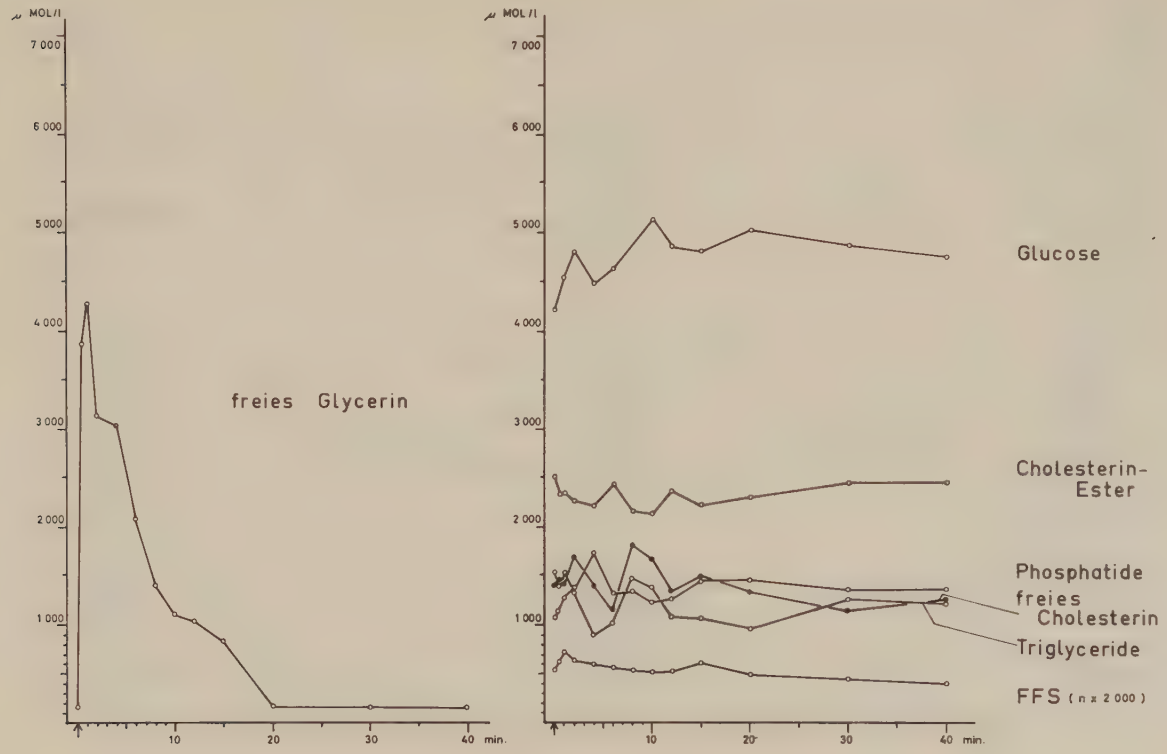


Abb.13b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

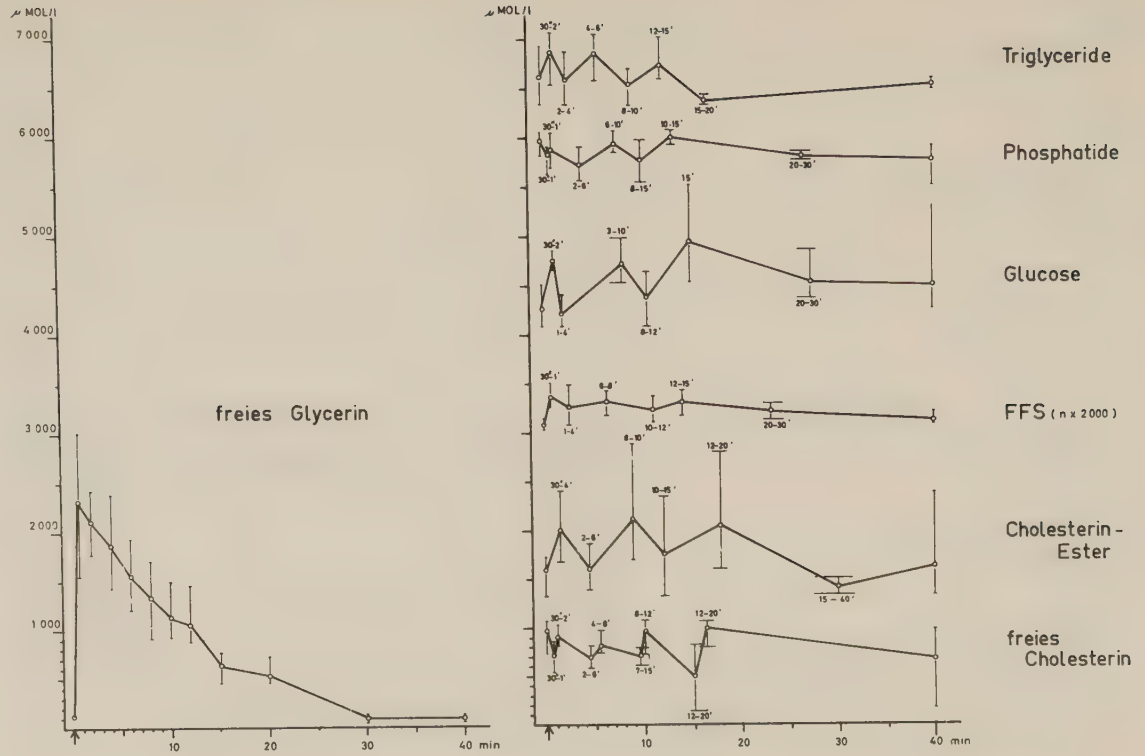


Abb.14a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs V

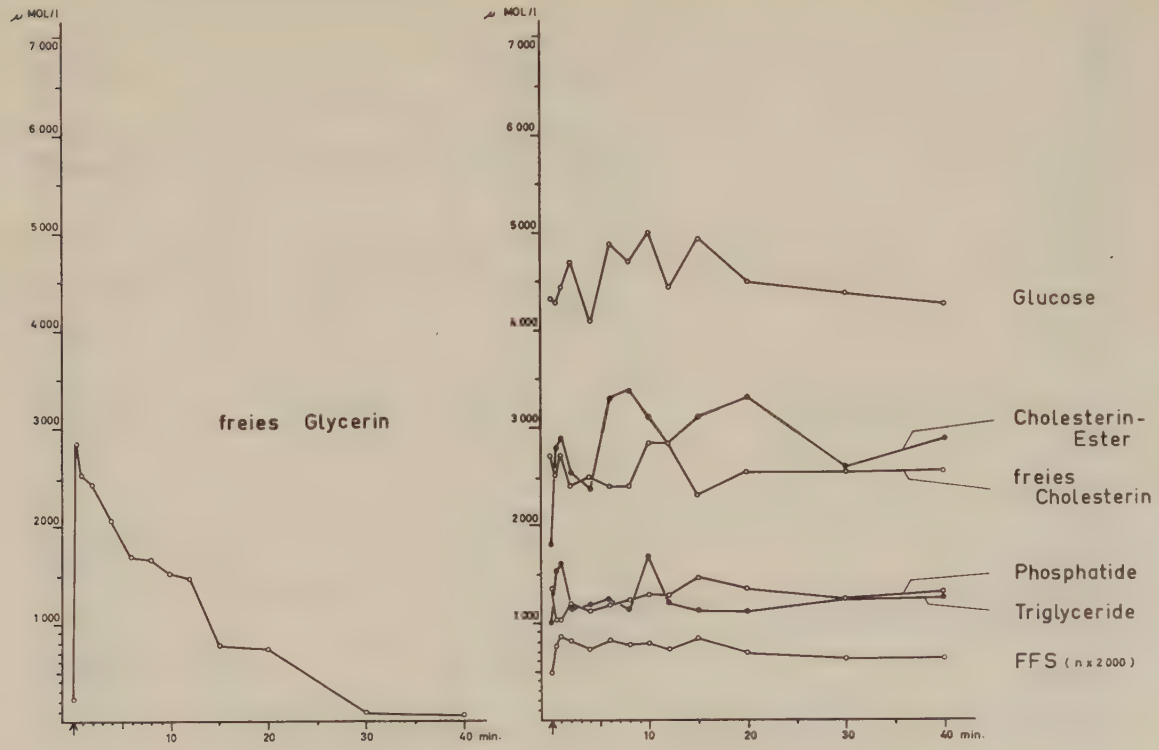


Abb.14b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

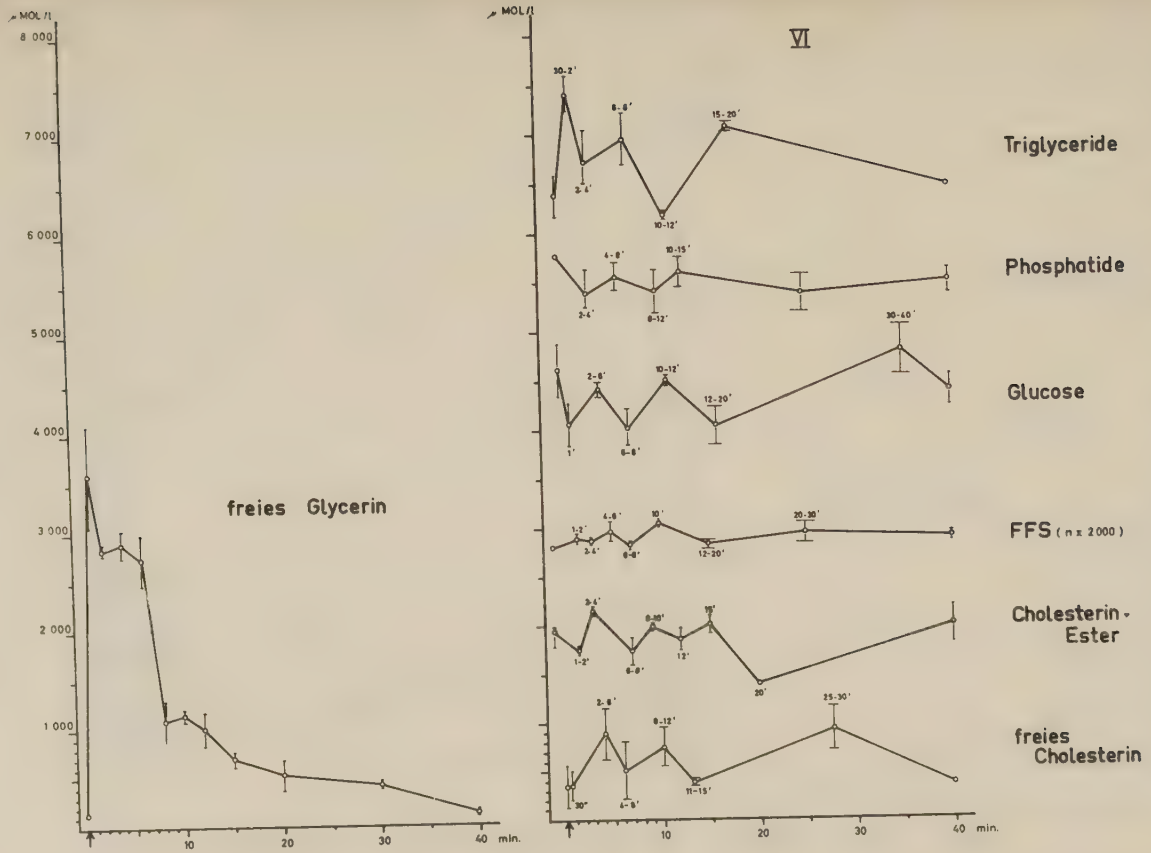


Abb.15a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs VI

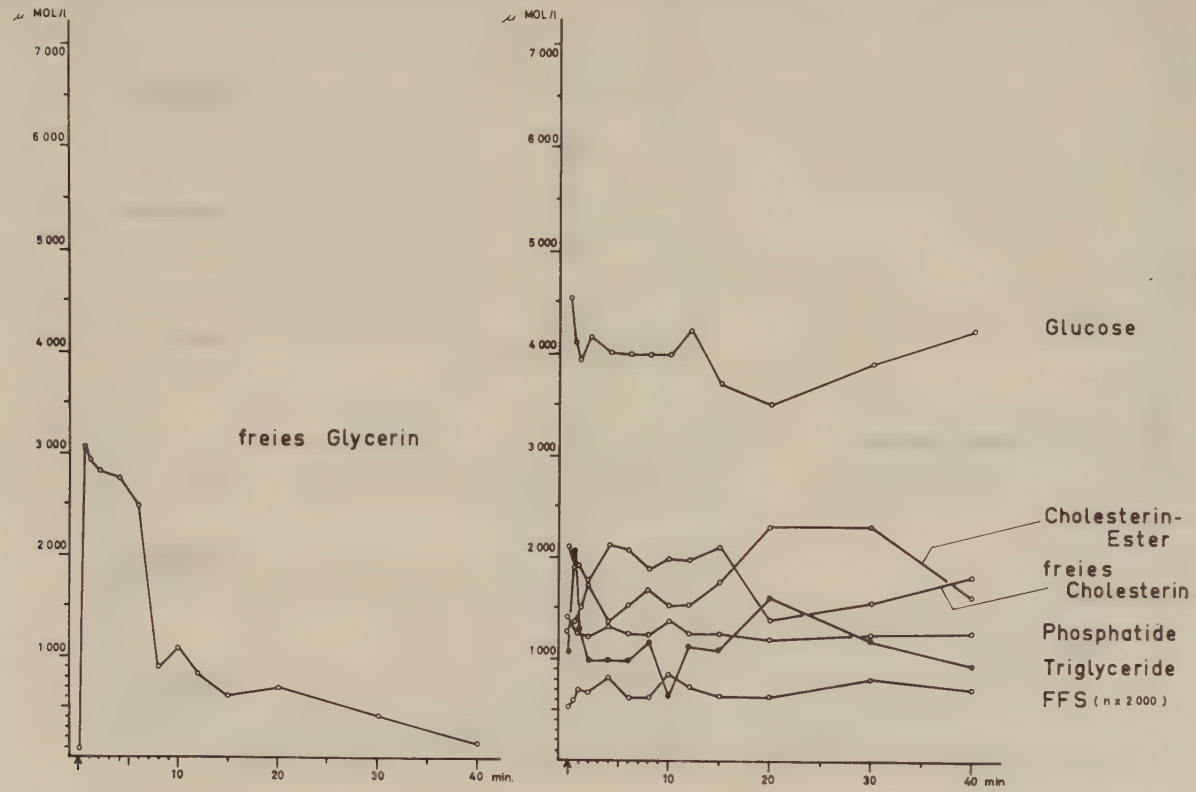


Abb.15b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

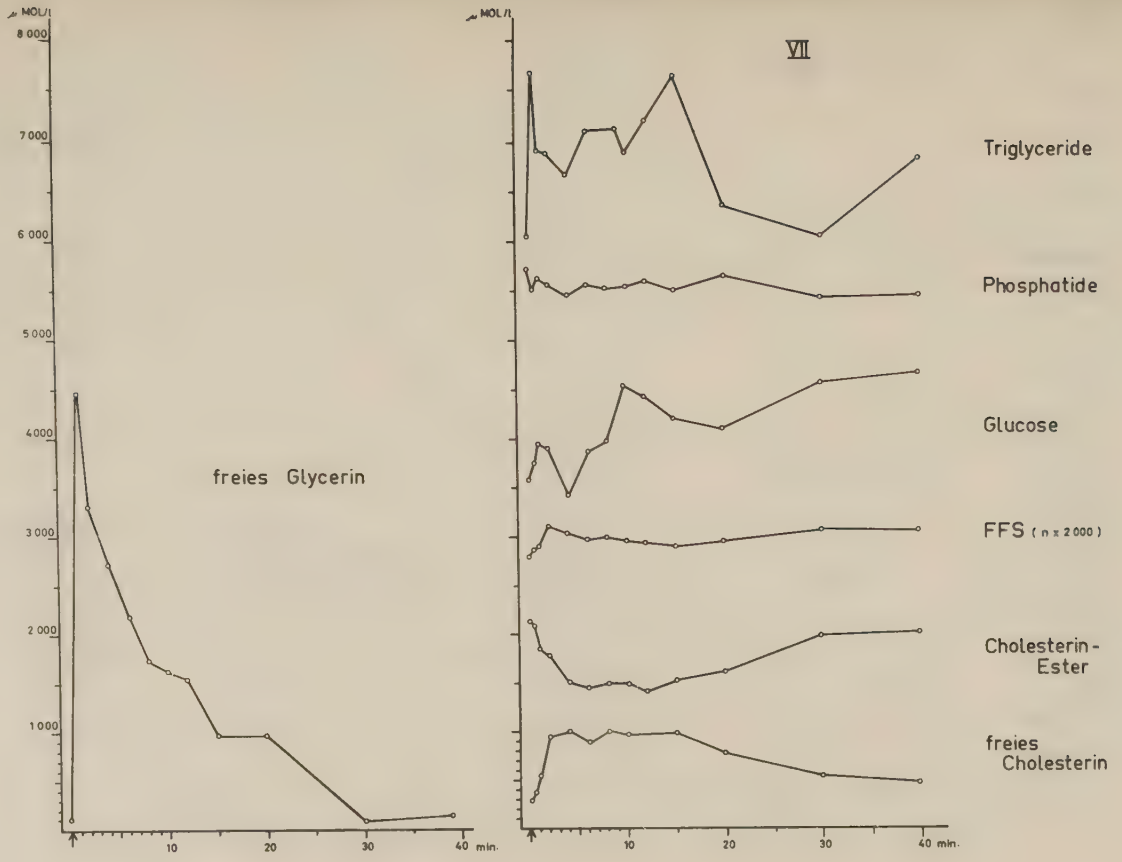


Abb.16a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs VII

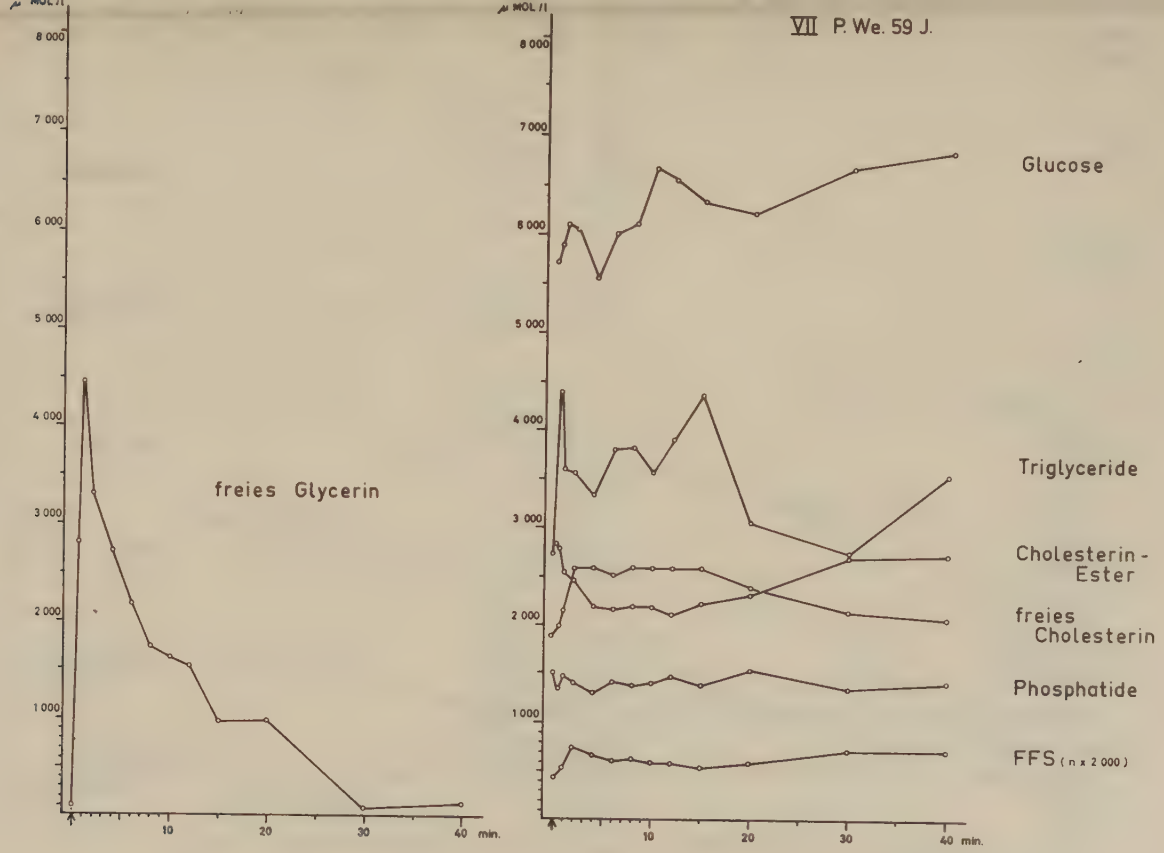


Abb.16b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

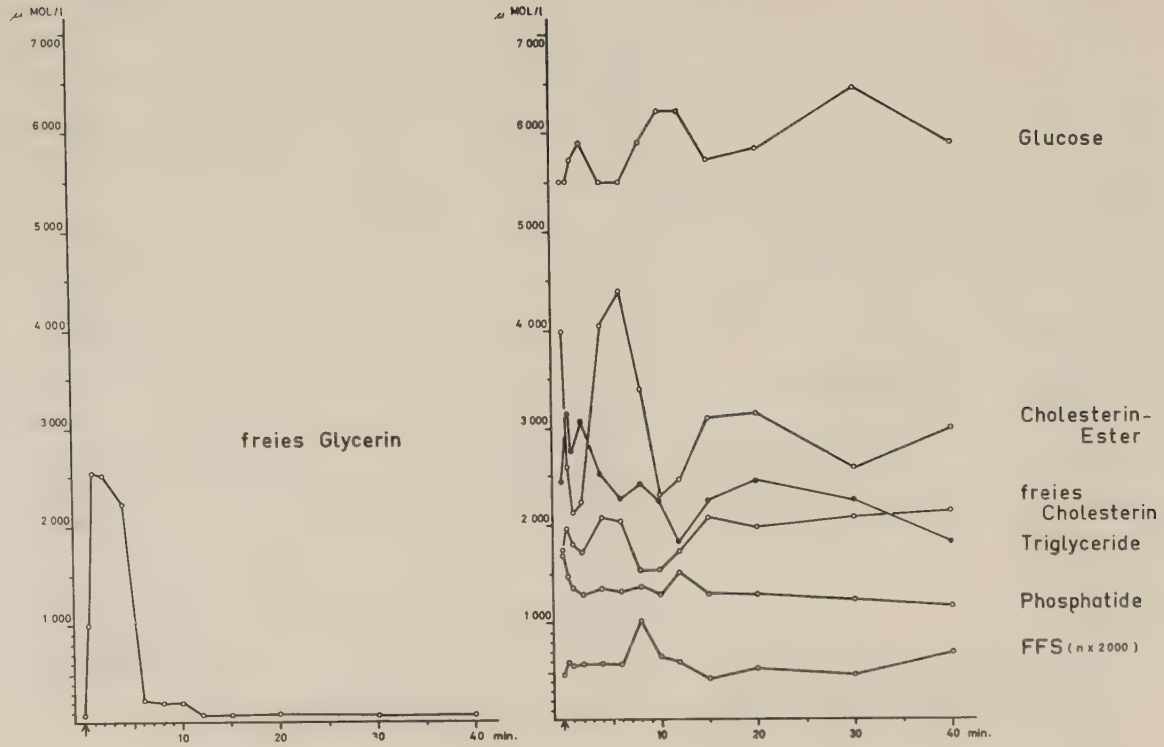


Abb.17a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs VIII

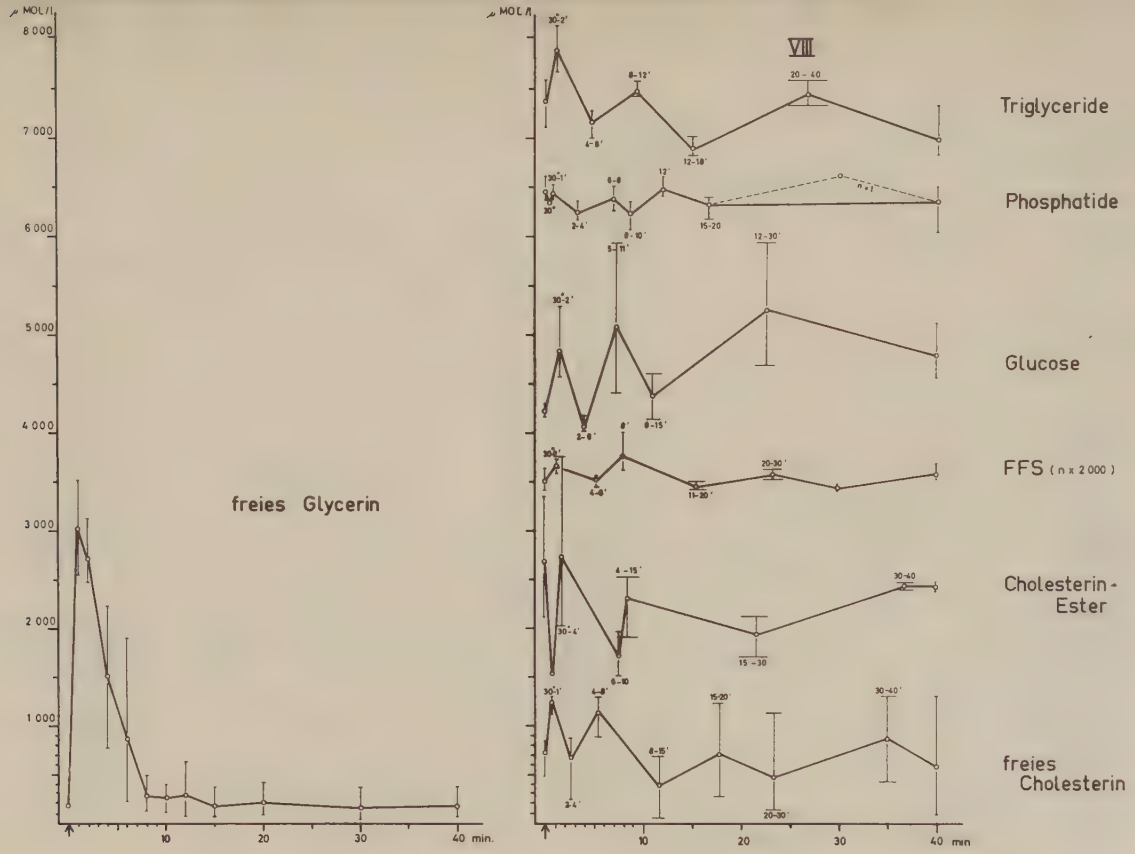


Abb.17b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

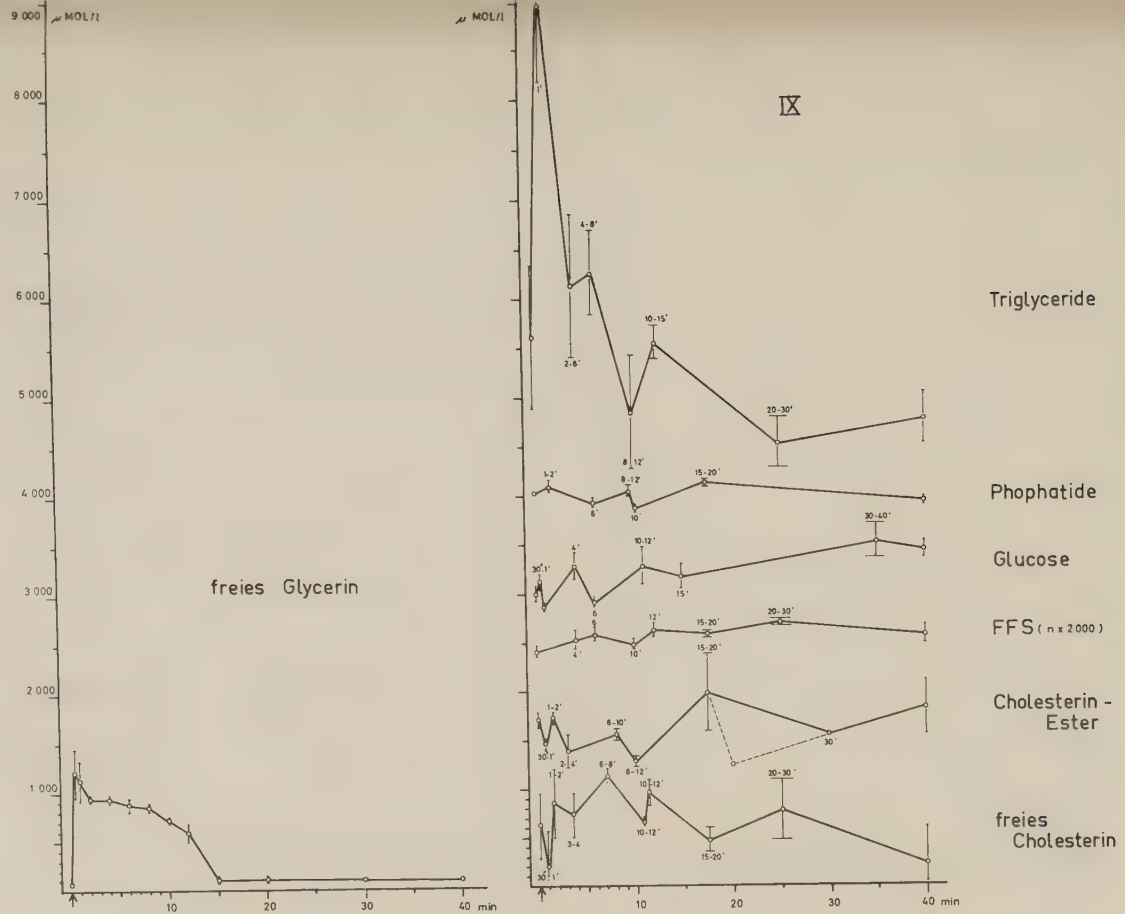


Abb.18a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs IX

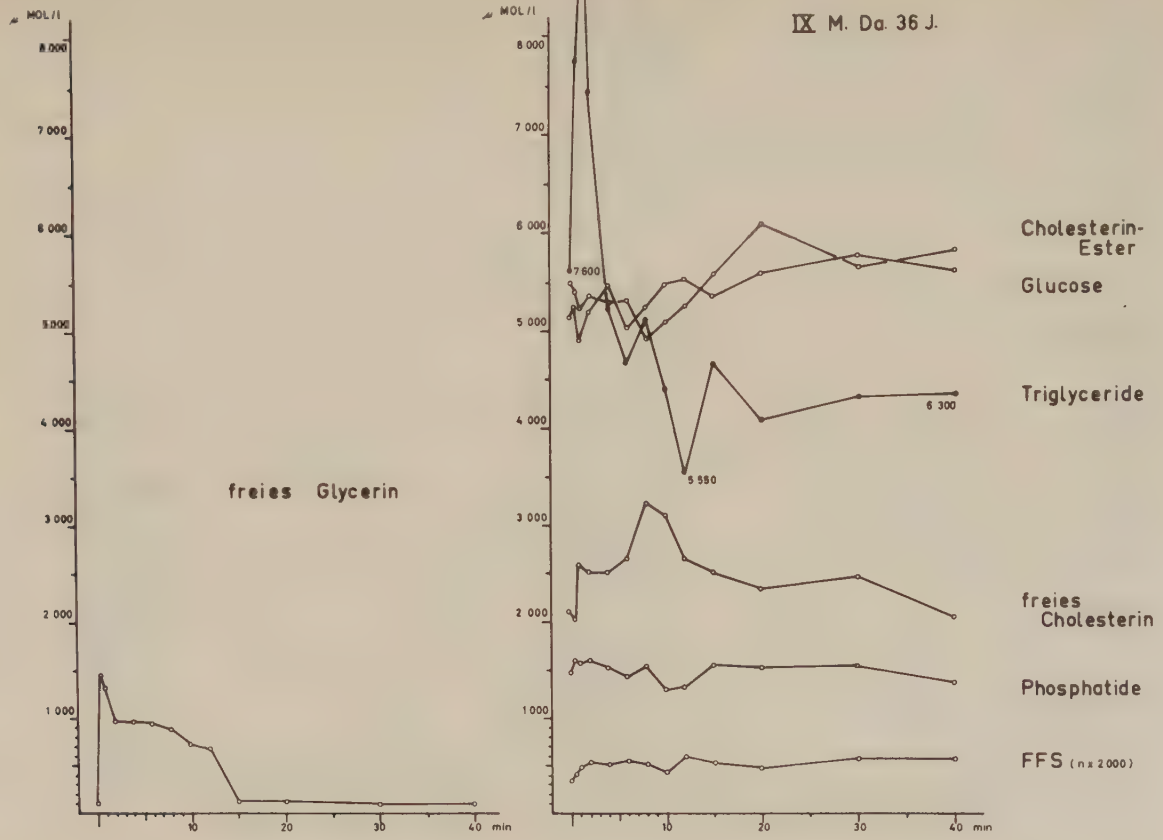


Abb. 18b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

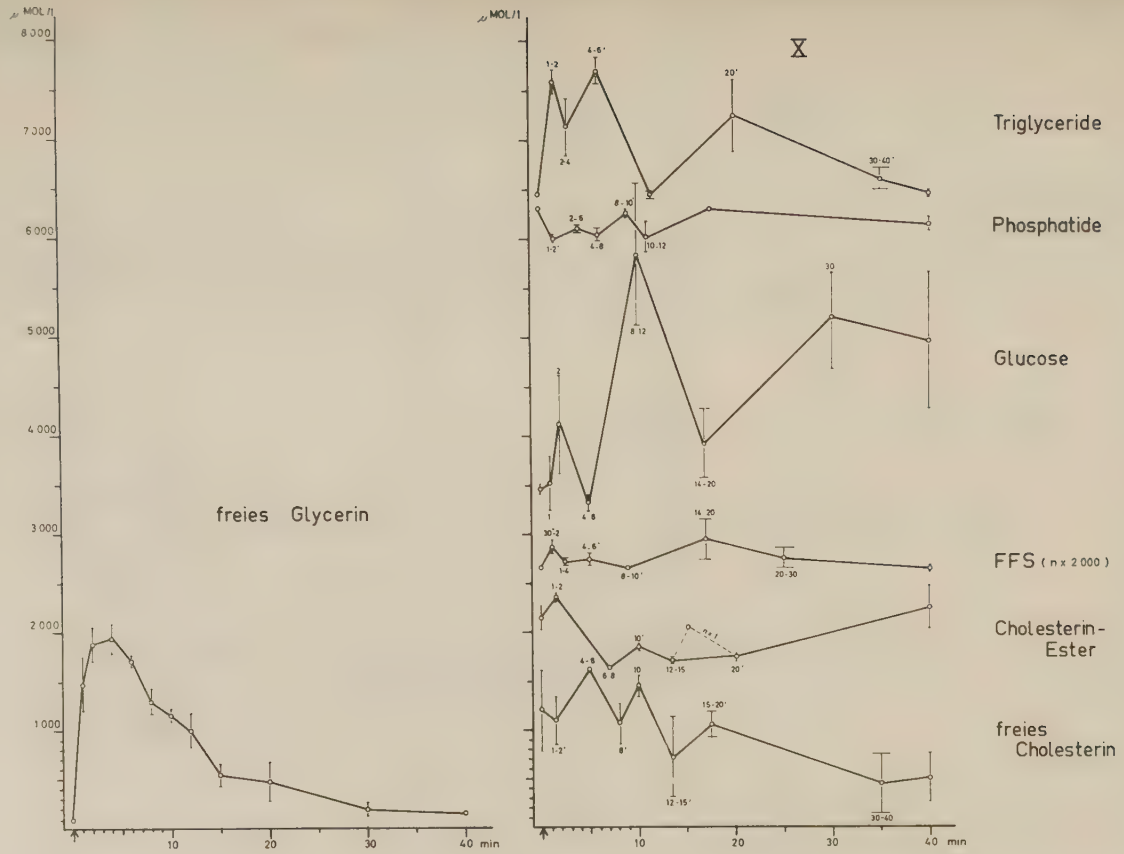


Abb.19a : Mittelwertskurven des Reaktionsmuster-Typs X

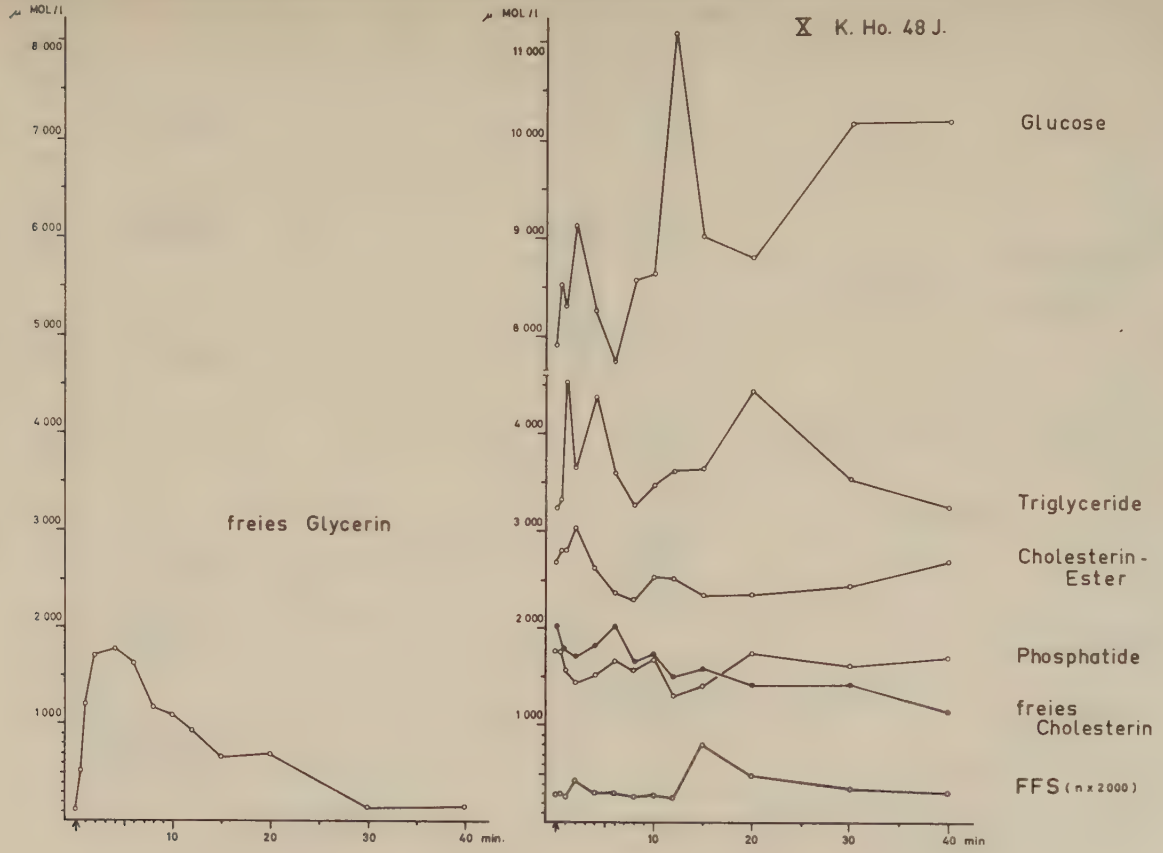


Abb.19b : Originalkurven eines Patienten dieses Typs

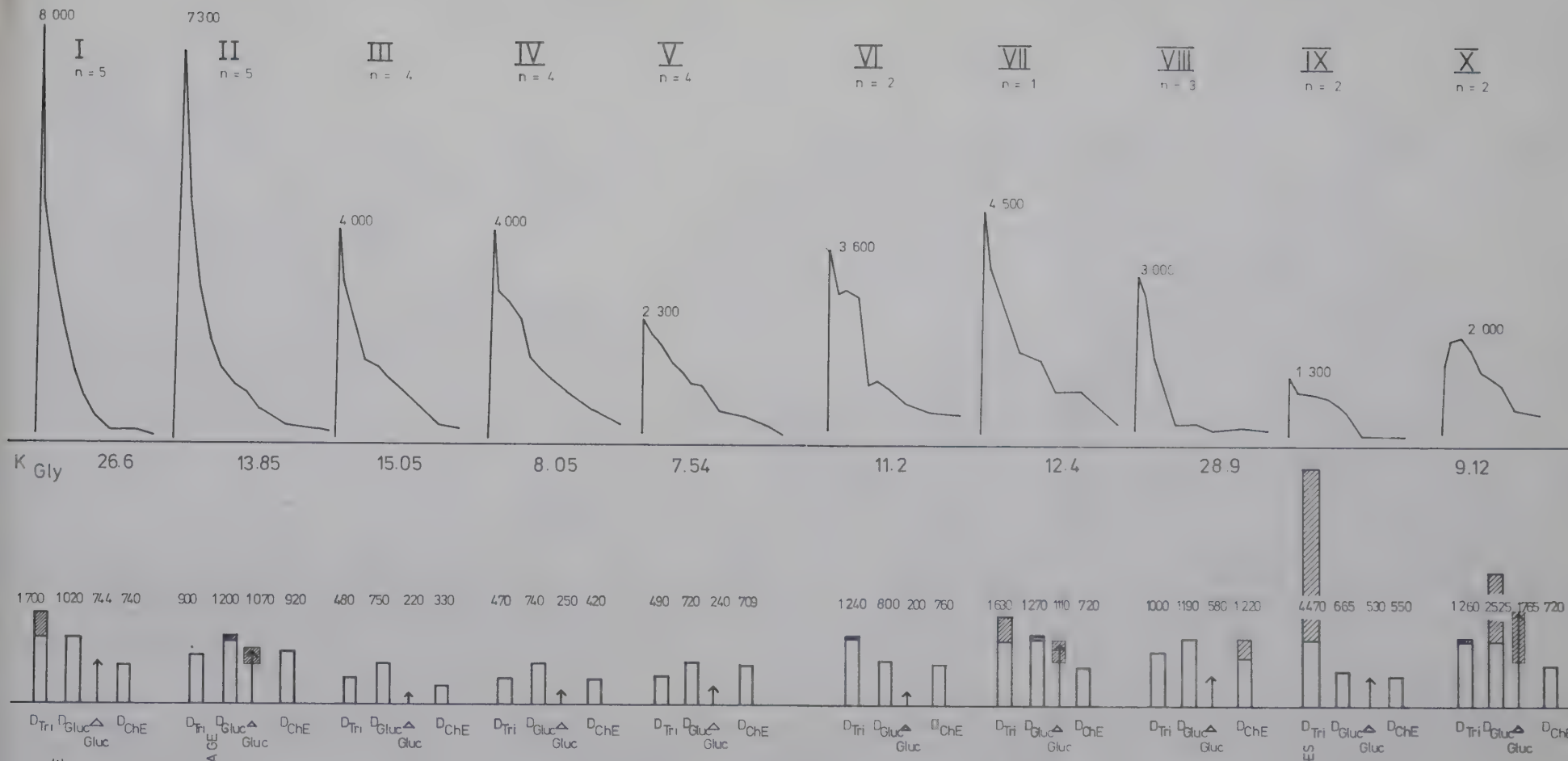

8 000
I
n = 5
7300
II
n = 5
III
n = 4
4 000
IV
n = 4
4 000
V
n = 4
2 300
VI
n = 2
3 600
VII
n = 1
4 500
VIII
n = 3
3 000
IX
n = 2
1 300
X
n = 2
2 000
K Gly
26.6
13.85
15.05
8.05
7.54
11.2
12.4
28.9
9.12
1700 1020 744 740
900 1200 1070 920
480 750 220 330
470 740 250 420
490 720 240 709
1240 800 200 760
1630 1270 1110 720
1000 1190 580 1220
4470 665 530 550
1260 2525 1765 720
D Tri D Gluc Gluc D ChE
5 X KRÄFTIGE LEBERSTEATOSEN
4 X DIABETISCHE STOFFWECHSELLAGE
1 X MANIFESTER DIABETES
1 X MÄSSIGE LEBERSTEATOSE
+ LEICHTE DIABET. STOFFWECHSELLAGE
4 X NORMALPERSONEN
CHRONISCHE HEPATITIS MIT SIDEROSE
+ DIABETISCHE STOFFWECHSELLAGE
+ HYPERTRIGLYCERIDAEMIE
3 X ÄDIPOSITAS
DAVON 1 X MIT GICHT
1 X MIT AETHYLISMUS
1 X MIT FETTFIBROSE
1 X AUSGEPRÄGTER LANGJÄHR DIABETES
MIT KIMMELSTIL WILSON
+ ADIPOSITAS
1 X HYPERTRIGLYCERIDAEMIE
+ DIABETISCHE STOFFWECHSELLAGE
+ ADIPOSITAS
1 X AUSGEPRÄGTER DIABETES
+ LEBERSTEATOSE
1 X LEBERSTEATOSE + SIDEROSE
+ LEICHTE DIABETISCHE STOFFWECHSELLAGE
NORMALPERSONEN

Abb. 20

In diesen Ergebnissen fällt auf, daß die Serumglycerinspiegel nach intravenöser Belastung ihre Maxima im allgemeinen bereits nach 1/2 bis 1 Minute erreicht haben. Als einzige Ausnahme tritt die Gruppe X hervor, wo bei relativ geringem Gesamtanstieg das Maximum erst nach etwa 4 Minuten erreicht wurde.

Bei der graphischen Bestimmung des Eliminationskoefizienten von Glycerin K_{Gly} erkennt man, daß bei den meisten Serumspiegeln zunächst eine sehr rasche Elimination erfolgt, die etwa nach der 2. bis 4. Minute in die Hauptausscheidungsgeschwindigkeit übergeht. Das ist in Abbildung 9 am Beispiel der Gruppe II dargestellt.

In den Gruppen III, IV, VI und IX wird eine kontinuierliche Elimination offenbar gestört. Das kommt in den Kurven durch ein bzw. zwei sekundäre Anstiege in Form von Ausbuckelungen zum Ausdruck, die in den jeweiligen Gruppen so konform vertreten sind, daß damit ein Zufallsergebnis mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Diese Sekundäranstiege lassen evtl. an die Ausschüttung eines Pools denken, etwa an einen Rückstrom des bei hoher Serumkonzentration zunächst in extravasale Depots ausgeströmten Glycerins oder auch an (evtl. regulatorische?) Lipolyse im Fettgewebe.

Die typischen Abweichungen der verschiedenen Gruppen voneinander sind in Abbildung 20 veranschaulicht. Neben der Form der Kurven des Serumglycerins waren es folgende fünf Charakteristika, die jeweils gleichsinniges gruppentypisches Verhalten zeigten:

1. Δ Gly: die Höhe des erreichten Gesamtanstiegs von freien Glycerin im Serum
2. D_{Tri} : die maximale Spiegeldifferenz der Triglyceride während des gesamten Beobachtungszeitraums

3. D_{Gluc} : die maximale Spiegeldifferenz der Glucose während des gesamten Beobachtungszeitraums
4. D_{ChE} : die maximale Spiegeldifferenz der Cholesterin-Ester während des gesamten Beobachtungszeitraums
5. Δ_{Gluc}: der Gesamtanstieg der Glucose im Beobachtungszeitraum gemessen vom Nüchternwert bis zum höchsten der dreißig- bis vierzig-Minutenwerte.

Dabei zeigt sich, daß in den Gruppen III bis VI, in denen sich ausschließlich gesunde Versuchspersonen befinden, der Gesamtanstieg von Glycerin (Δ_{Gly}) weniger als 5000 μ Mol/l beträgt, daß sich die maximale Spiegeldifferenz der Triglyceri (D_{Tri}) im allgemeinen zwischen 300 und 800 μ Mol/l bewegt, allerdings bei einer Gruppe (Nr. VI) auch bis 1250 μ Mol/l erreicht. Auch die maximalen Spiegeldifferenzen von Glucose und Cholesterin-Ester bewegen sich in ähnlichen Bereichen und übersteigen nicht den Wert D_{Gluc} von 1000 μ Mol/l bzw. D_{ChE} von 850 μ Mol/l. Der Gesamtanstieg der Glucose (Δ_{Gluc}) bleibt in der Regel dabei unter 300 μ Mol/l, lediglich in ganz wenigen Ausnahmen erreicht er Werte bis 750 μ Mol/l.

In den Gruppen, in denen sich ausschließlich Kranke Personen befinden, erkennt man dagegen regelmäßig Abweichungen von diesem Verhalten in wenigstens einem der genannten 5 Charakteristika.
Gruppe I zeigt ein Δ_{Gly} von über 6000 μ Mol/l, zudem D_{Tri} bis 2000 μ Mol/l. In Gruppe VII beträgt D_{Tri} im Mittel 1630 μ Mol/l, D_{Gluc} 1270 μ Mol/l und Δ_{Gluc} 1110 μ Mol/l. Gruppe VIII fällt durch den hohen Wert D_{ChE} 1220 μ Mol/l auf. Hier liegt auch D_{Gluc} mit einem Mittel von 1187 μ Mol/l höher. In Gruppe IX finden sich bei äußerst niedrigem Gesamtanstieg des Glycerins extrem hohe Spiegeldifferenzen der Triglyceride von 4470 μ Mol/l im Mittel.

Die Gruppe X ist bereits charakterisiert durch den verzögert ansteigenden Glycerinspiegel mit einem Maximum nach 4 Minuten. Gleichzeitig weist sie hohe Differenzen D_{Gluc} von 2525 µ Mol/l und hohen Anstieg der Glucose von 1765 µ Mol/l im Mittel auf.
Die Gruppe II, die sich von vornherein nicht klar in das Schema gesunder oder kranker Versuchspersonen einordnen ließ, zeigt auch hier Abweichungen vom Verhalten der Gruppen gesunder Versuchspersonen in drei der genannten 5 Charakteristika: Der Gesamtanstieg der Glycerinspiegel Δ_{Gly} beträgt über 5000 µ Mol/l, die maximale Spiegeldifferenz der Glucose D_{Gluc} beträgt 1200 µ Mol/l bei gleichzeitigem Gesamtanstieg der Glucose Δ_{Gluc} von 1072 µ Mol/l im Mittel.

Zusammenfassend kann man aus diesen Versuchen postulieren, daß bei einer intravenösen Glycerinbelastung mit 75 mg Glycerin pro kg Körpersollgewicht nach der hier beschriebenen Methode das Erreichen folgender Blutwerte dem Ergebnis von Belastungen gesunder Versuchspersonen nicht mehr entspricht. Dies gilt besonders dann, wenn wenigstens zwei dieser Charakteristika zusammenfallen:

1. a) Anstieg des Serumglycerinspiegels auf Werte über 6000 µ Mol/l bzw. auf weniger als 1500 µ Mol/l.
   b) Erreichen eines Gipfelpunktes der Serumglycerinkurve erst später als eine Minute nach Injektionsende.
2. Maximale Spiegeldifferenz D_{Tri} 1250 µ Mol/l.
3. Maximale Spiegeldifferenz D_{Gluc} 1200 µ Mol/l.
4. Maximaler Gesamtanstieg $_{Gluc}$ 800 µ Mol/l.
5. Maximale Spiegeldifferenz D_{ChE} 900 µ Mol/l.

Eine Serie von 5 intravenösen Glycerinbelastungen, die mit 50 anstatt 75 mg Glycerin pro kg Körpersollgewicht durchgeführt wurde, brachte ähnliche Ergebnisse . Allerdings wurden

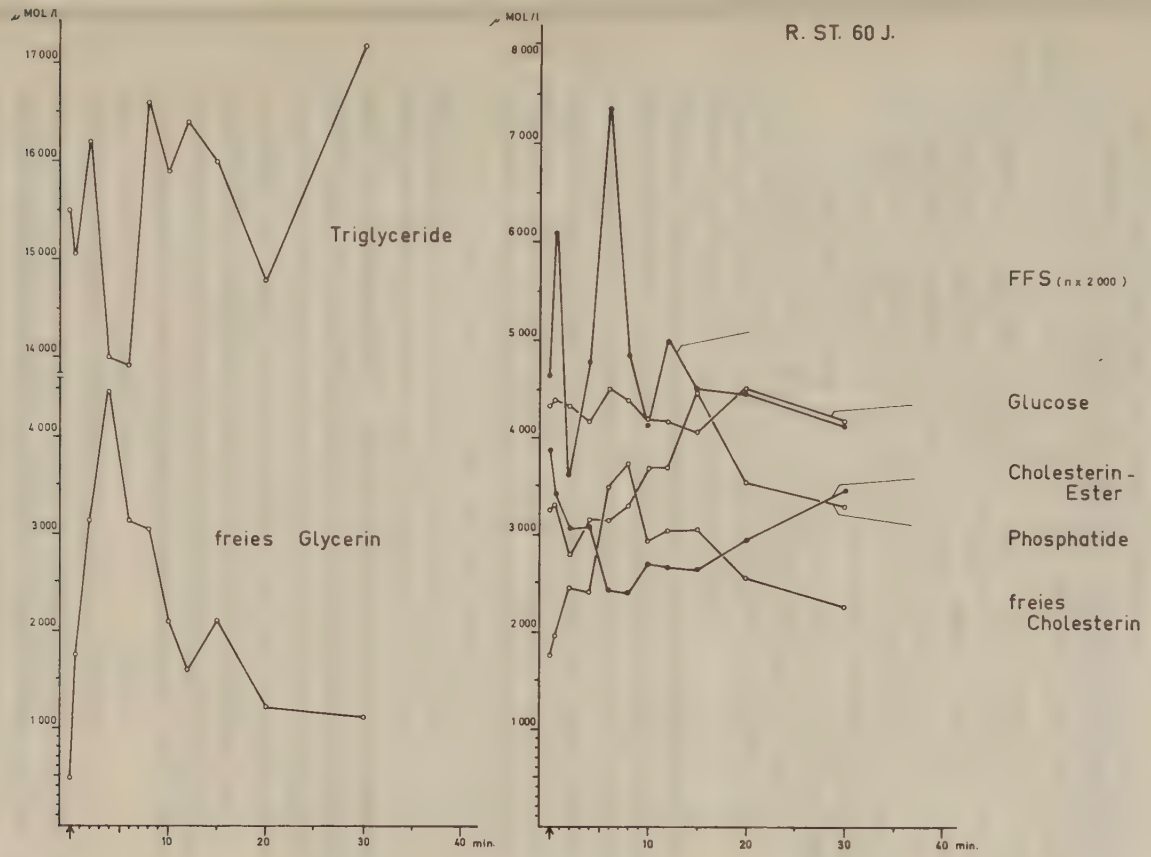


Abb.21 : Hepatit.kleinknotige Lebercirrhose. 50 mg/kg i.v.

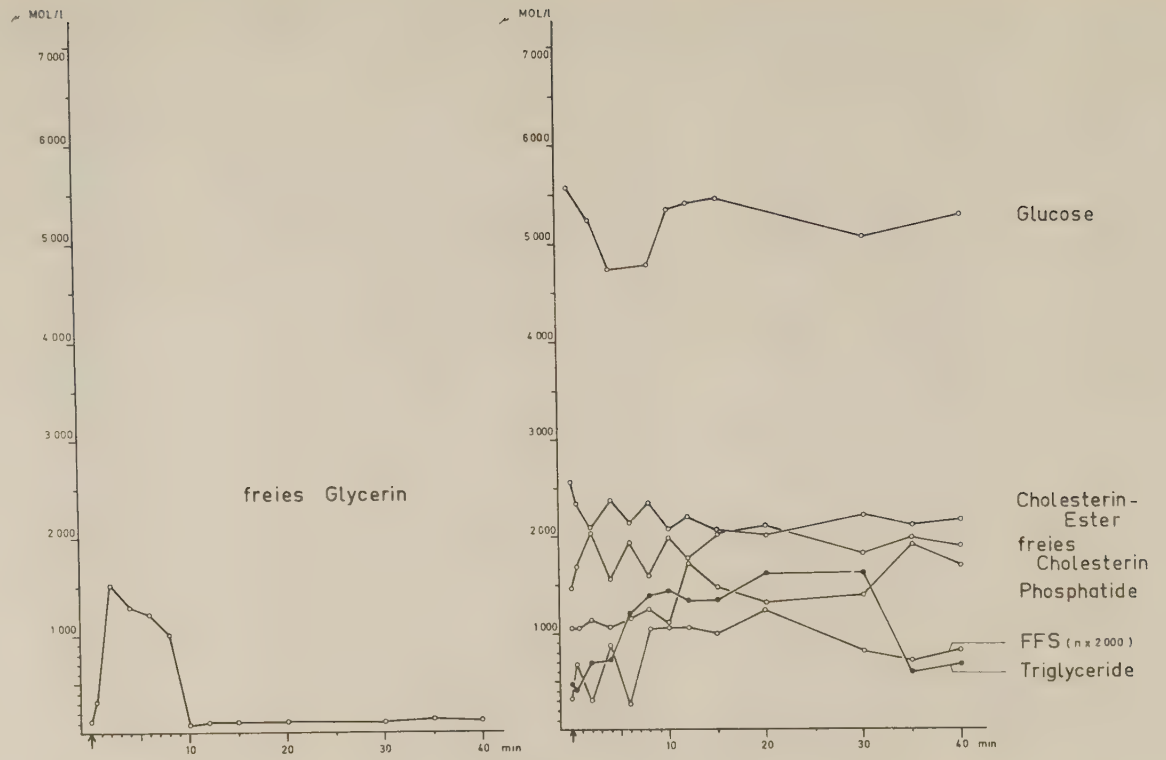


Abb.22 : Subchron.anikterische Hepatitis. 50 mg/kg i.v.

hier die Gipfelpunkte des Glycerinspiegels erst nach 2 Minuten erreicht mit Ausnahme eines Patienten mit hochgradiger Lebersteatose. In diesem Fall lag der Gipfelpunkt bei 30 Sekunden, Δ_{Gly} bei 3000 μ Mol/l, D_{Tri} bei 1700 μ Mol/l, D_{Gluc} bei 1000 μ Mol/l, Δ_{Gluc} bei 1000 μ Mol/l, D_{ChE} bei 650 μ Mol/l. Der Befund paßt in den Reaktionstyp VII.
Als Besonderheit fand sich bei 3 dieser 5 Belastungsversuche eine ungewöhnlich starke Mitreaktion der freien Fettsäuren (FFS). Abbildung 21 zeigt dies am Beispiel eines Patienten mit histologisch gesicherter, noch aktiver hepatitischer kleinknotiger Lebercirrhose. Bereits der Nüchternspiegel der FFS lag hier ungewöhnlich hoch. Dieser Fall läßt sich nicht in eine der genannten 10 Reaktionstypen einordnen.

Aber auch die Annahme, daß es sich um ein für Lebercirrhose typisches Verhalten handeln könnte, bestätigte sich nicht, da die andere Patientin mit Lebercirrhose bei dieser Belastungsart (siehe Abbildung 8 a) ein anderes Bild ergab. Eine weitere intravenöse Belastung von 50 mg/kg ist in Abbildung 22 dargestellt bei einem Patienten mit subchronischer anikterischer Hepatitis. Er paßt ansonsten in den Reaktionstyp V mit Ausnahme des recht hohen D_{Tri} 1200 μ Mol/l und der genannten starken Mitreaktion der FFS.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen über den Stoffwechsel des Glycerins beim Menschen galten zunächst der Ermittlung der Normalwerte des Glycerinspiegels im Blut gesunder Probanden. Die mitgeteilten Daten gewinnen dadurch an Sicherheit, daß sie mit zwei verschiedenen enzymatischen Methoden bestimmt wurden, wobei sich weitgehende Übereinstimmung ergab. Der normale Serumglycerinspiegel liegt demnach zwischen 60 und 110 µ Mol/l, das entspricht 0,5 bis 1 mg%. Spuren von Glycerin sind auch im Harn nachweisbar. Die Blutspiegel sind den von Shafrir und Gorin (1963) (91), Spinella und Mager (1966) (94), Jahnke et al. (1964) (58), Pelkonen et al. (1967) (84) und Laurell und Tibbling (1968) (68) mitgeteilten Daten vergleichbar. Von anderen Autoren wurden Normalwerte etwas über 1 mg% angegeben (Eggstein, 1965 (24)):120,2 ± 65 µ Mol/l = 1,10 ± 0,6 mg% und G. Hermann (49): 128,83 ± 22,7 µ Mol/l = 1,18 ± 0,20 mg%.

Außer den von Eggstein (24) diskutierten Faktoren für diese Diskrepanz wie Probeentnahmefehler, unterschiedliche Blutentnahmebedingungen oder andersartige Vorbereitung der Probanden, kann aufgrund der vorliegenden Arbeit auch beispielsweise Nichtberücksichtigung von Stress im Hungerzustand bei der Auswahl der Normalwerte eine Rolle spielen.

Erhöhte Glycerinspiegel im Blut wurden bisher beim Diabetes mellitus (Pelkonen et al. 1966 (84) und bei Hyperthyreose (Tibbling, 1968 (106) beobachtet. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen,finden sich auch bei

Hepatitis, Lebercirrhose und Fällen von Fettsucht signifikant erhöhte Glycerinblutspiegel. Bei den Leberkrankheiten wäre ursächlich an eine Herabsetzung der Fähigkeit der Leber zur Phosphorylierung von Glycerin zu denken. Bei den adipösen Patienten könnte ein vermehrter Zustrom von Glycerin aus dem Fettgewebe eine Rolle spielen. Dafür spricht jedenfalls die bekannte Tatsache, daß auch die Konzentration der freien Fettsäuren bei Fettsüchtigen im Blut erhöht ist. Für die Steigerung des Glycerinspiegels in der Schwangerschaft und unter Stress-Situationen kommt als plausible Ursache eine durch Katecholamine und andere Faktoren gesteigerte Lipolyse in Betracht (siehe auch 42, 97).

Über die Geschwindigkeit des Glycerinumsatzes im Organismus sagt die Höhe des Blutspiegels nichts aus. Hierüber geht näheres aus den Untersuchungen des Blutspiegels und der Glycerinausscheidung nach Belastung hervor. Bereits aus den Versuchen mit oraler Belastung war auf einen sehr raschen Umsatz des Glycerins zu schließen. So wurden von einer Dosis von 50 g Glycerin nur 10 % durch die Niere ausgeschieden, die Hauptmenge mußte also utilisiert worden sein. Über die Geschwindigkeit dieser Utilisation läßt die intravenöse Glycerinbelastung genauere Aussagen zu. Nach dem in Abbildung 9 dargestellten Versuch beträgt die Halbwertzeit der Glycerinelimination aus dem Blut etwa 5 Minuten. Dies entspricht einer Eliminationskonstante K = 13,85.

Im Durchschnitt ergeben sich aus allen hier durchgeführten intravenösen Glycerintoleranztests Halbwertszeiten zwischen 2,6 und 9,2 Minuten, also K-Werte zwischen 7,5 und 26,6. Dies deutet auf eine sehr rasche

Verwertung des Glycerins hin, die etwa 5 - 10-mal schneller erfolgt als diejenige der Glukose. Die vorliegenden Daten stimmen gut mit denen von Pelkonen et. a. (1967) (84) überein. Von anderer Seite wurde für den Menschen eine Halbwertszeit der Glycerinelimination von nur 2 Minuten angegeben. (Schwarz et al. 1962) (98). Eine Halbwertszeit von 19,2 $\pm$ 4,2 Minuten wurde von Laurell und Tibbling (1968) (68) mitgeteilt, wobei allerdings mit konstanter Glycerinfusion gearbeitet wurde.

Bei den nun folgenden Glycerinbelastungsversuchen von Leberkranken wurde von der Vorstellung ausgegangen, daß hier infolge einer Beeinträchtigung der Glycerinphosphorylierung eine verminderte Glycerintoleranz vorliegen könnte, die sich möglicherweise diagnostisch aus dem Verhalten des Blutspiegelprofils verwerten ließe. Diese Erwartung bestätigte sich in 3 von 5 Fällen mit akuter Hepatitis, wo es nach oraler Glycerinbelastung zu einem höheren Glycerinanstieg im Blut und einer verzögerten Elimination kam. Bei den beiden anderen Patienten, bei denen die Hepatitis bereits im Abklingen war, zeigte sich nichts Auffälliges. Es bedarf offenbar einer tiefgreifenden entzündlichen Schädigung der Leberzellen, um eine sichtbare Glycerinverwertungsstörung herbeizuführen. Wie Abbildung 7 zeigt, fanden sich auch bei anderen Lebererkrankungen, wie Verschlußikterus, cholestatischer Hepatitis und bei Lebercirrhose, Anzeichen einer Verwertungsstörung im oralen Glycerintoleranztest.

Gegenüber der oralen Glycerinbelastung schien die intravenöse Verabreichung von Glycerin von Vorteil, da hierdurch die Unsicherheiten bezüglich der Resorption im Wegfall kommen. Außerdem erschien es zweckmäßig, außer dem

Verhalten des Glycerins auch die Spiegel der verschiedenen Lipidfraktionen sowie der Glukose im Blut mitzubestimmen. Bei der Auswertung der sehr großen Anzahl von Einzeldaten ergaben sich zunächst keine klaren Zusammenhänge des Blutspiegelprofils mit bestimmten Krankheitsformen. Die Verhältnisse scheinen nach intravenöser Belastung überraschenderweise wesentlich komplizierter zu sein, als nach oraler Belastung. Als Ursache dafür muß man die stärkere Störung der Gleichgewichtsverhältnisse infolge des sehr raschen Anstiegs des Glycerinspiegels in Betracht ziehen.

Bei Sichtung der Glycerinspiegelkurven fiel jedoch auf, daß bestimmte unterschiedliche Muster immer wiederkehrten. Es wurde deshalb versucht, das Gesamtkollektiv zunächst ohne Rücksicht auf den individuellen Fall nach diesen Mustern zu ordnen und mit den übrigen Metabolitspiegelveränderungen in Verbindung zu bringen. Dabei zeigte sich, daß die Eliminationsgeschwindigkeit für Glycerin alleine noch keinen befriedigenden Indikator darstellt. Erst durch das zusätzliche abnorme Verhalten eines der übrigen Parameter zeichnen sich die Patientenkollektive von den Normalversuchspersonen ab. Dies wird z.B. aus der starken Zunahme der Triglyceride und der Glukose bei den schweren Diabetesfällen in Abbildung 20 deutlich.

Die Ergebnisse der intravenösen Glycerinbelastungsversuche können keineswegs als abgeschlossen betrachtet werden. Sie dürften jedoch einen Weg aufzeigen, um eventuell zu einer Verfeinerung der Diagnostik bestimmter Leber- und Stoffwechselerkrankungen zu kommen. Hierzu erscheinen umfangreichere Untersuchungen erforderlich.

Zusammenfassung

Unter Verwendung einer spezifischen optisch-enzymatischen Methode wurden Untersuchungen über den Stoffwechsel des Glycerins beim Menschen durchgeführt. Folgende ERgebnisse wurden erhalten:

1. Der Serumglycerinspiegel beim nüchternen Gesunden beträgt 82,2 ± 20,66 µ Mol/l (Bereich: 41 - 115 µ Mol/l), das entspricht 0,76 ± 0,18 mg% (Bereich: 0,38 - 1,06 mg%). Beim Vergleich zwei verschiedener Methoden weichen diese Werte nicht signifikant voneinander ab. Mit dem Harn werden etwa 10 - 20 mg pro Tag Glycerin ausgeschieden.

2. Der Serumglycerinspiegel ist nach Einnahme einer fettreichen Mahlzeit nicht über den Normbereich erhöht. Orale Belastung mit Fructose hat keinen Einfluß auf den Serumglycerinspiegel.

3. Signifikante Erhöhungen der Serumglycerinspiegel wurden bei akuter Hepatitis, bei Lebercirrhose, bei Adipositas und bei chronischer Nephritis gefunden. Auch in der Gravidität und nach körperlicher Anstrengung im Hungerzustand ist der Glycerinspiegel signifikant über die Norm erhöht.

4. Nach oraler Glycerinbelastung findet sich bei akuten Hepatitisfällen und schweren chronischen Lebererkrankungen ein deutlich erhöhter Glycerinanstieg im Serum. Dies wird als Zeichen einer gestörten Glycerinverwertung infolge herabgesetzter Phosphorylierungskapazität der Leber angesehen.

5. Durch intravenöse Glycerinbelastung wurde bei gesunden Versuchspersonen die Glycerinverwertung untersucht. Dabei ergaben sich Halbwertszeiten für Glycerinelimination zwischen 2,6 und 9,2 Minuten. Demnach erfolgt die Utilisation von Glycerin wesentlich rascher als diejenige von Glukose.

6. Die intravenöse Glycerinbelastung zur Aufdeckung und Klassifizierung von Leber- und Stoffwechselfunktionsstörungen, vor allem auch bei Lipidstoffwechselanomalien, erbrachte keine sicheren Ergebnisse. Durch Hinzuziehung weiterer Blutparameter, besonders der Lipidfraktionen und Glucose scheint sich eine Möglichkeit zur Verfeinerung der Diagnostik, unter anderem subklinischer Leberfälle, abzuzeichnen. Dazu bedürfte es weiterer Untersuchungen.

L i t e r a t u r

1. Adam, H: in H.U. Bergmeyer: Methoden zur enzymatischen Analyse S. 573 - 577, Verlag Chemie Weinheim, 1962
2. Ayers, C.W.: Analyt. Chim. Acta 15 (1956), 77
3. Ashmore, J., A.E. Renold, F.B. Nesbett a. A.B. Hastings: Studies on carbohydratmetabolism in rat liver slices! V. Glycerol metabolism in relation to other substrats in normal and diabetic tissue. J. biol. Chem. 215, 153 161 (1955)
4. Barker, H.A. and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. 179, 1949/247
5. Baranowski, I.: J. of Biol. Chem. 180, (1949) 535
6. Bergmann E.N.: Glycerol turnover in the non pregnant and ketotic pregnant cheep
7. Bergmeyer H.U. und E. Bernt: D-Glucose, Bestimmung mit Glucoseoxydase und Peroxydase, in Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Chemie-Verlag, Weinheim 1962, S. 123
8. Bloch, K.: Ann. Rev. Biochem. 21, (1952) 285
9. Bloor: J. of biol. Chem. 22 (1915) 133
10. Borchgrevink, C.F. a. R.J. Havel: Transport of Glycerol in human Blood. Proc. Soc. exp. Biol. 113, 946-949 (1963)
11. Boyd: Arch. of Pathol. 16, (1933) 350-372
12. Bublitz, C. and E. P. Kennedy: Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria, J. of Biol. Chem. 211, (1954) 951
13. Bücher Th. u. M. Klingenberg: Ann. Rev. Biochem. 29, (1960) 669
14. Bücher Th. und M. Klingenberg: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation, Angew. Chemie 70, (1958) 552
15. Burckard, H.: Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine, Inaug. Diss. Rostock 1889
16. Carlson L.A. a. L. Orö: Studies on the Relationship between the concentration of plasma free fatty acids and Glycerol in vivo. Metabolism 12, 132 - 142 (1963)

17. Carlson L. A. und L.B. Wadström: Determination of Glycerids in Blood Serum, Clin. Chim Acta 4 (1959) 197
18. Catron L.F. and H.B. Lewis: J. of Biol. Chem. 84 (1929) 553
19. Clark, B. and G. Hübscher: Glycerokinase in mucosa of the small intestine of the cat, Nature 195 (1962) 599
20. Cori, C.F. and W.M. Shine: Science (Lancaster, Pa.) 82, (1935) 134
21. Doerschuk, A.P. Some Studies on the Metabolism of Glycerol-1-C J. Biol. Chem. 193. 39 -44- (1951)
22. Duncombe W.G.: The Colorimetric Mkro-Determination of Long-Chain Fatty Acids, Biochem. J. 88 (1963) 7
23. Edson, N.L.: Biochem. J. 30 (1936)1855
24. Eggstein, M.: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe II., Normalwerte f. Triglyceride und Glycerin im menschlichen Blut, Klin. Wschr. 44, (1966) 267
25. Eggstein M. u. F.H. Kreutz: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe, Klin. Wschr. 44, (1966) 262
26. Eggstein, M.: Unveröffentlichte Laboranleitung: Bestimmung des Lipoidphosphors und der Serum-Phosphatide, 1962
27. Eymer K.P., K. Kopetz, K. Schwarz und K. Weinges: Das Verhalten des Glycerins, der nicht veresterten Fettsäuren und der Glycose an der perfundierten Rattenleber, Klin. Wschr. 39 (1961) 1086
28. Fiske C.H. and Y. Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus, J. of biol. Chem. 66 (1925) 375
29. Fried R. und Hoeflmayr: Klin. Wschr. 41, (1963) 727
30. Freund G.: The Metabolic Effekts of Glycerol Administered to Diabetic Patients, Arch. Intern. Med. 121 (1968) 123
31. Galletti F.: A.simplified procedure for the colorimetric determination of Serum esterified fatty acids, Clin. Chim. Acta 6, (1961) 749

32. Garland P.B. and P.J. Randle: Nature 196, (1962) 987
33. Gidez L.I. and L.M. Karnowsky: J. of Biol. Chem. 206, (1954) 229
34. Green A.A.: Biochem. J. 31, (1937), 1074
35. Grunnet N. and F. Lundquist: Kinetics of Glycerol Kinases from Mammalian Liver and Candida myooderma, Europ. J. Biochem. 3 (1967) 78-84
36. Gunsalus, I.C. and W.W. Umbreit: J. Bacter 49, (1945) 347
37. Haessler, H.A. and K.J. Isselbacher: The metabolism of Glycerol by intestinal mucosa, Biochim et Biophys. Acta 73 (1963) 427
38. Hagen, J.H.: Glycerol metabolism in Rabbits, Can. J. Biochem. 46 (1968) 1107-1114
39. Hagen, J.H.: The effect of Insulin on the concentration of plasma glycerol, J. Lipid Res. 4, 46-51 (1963)
40. Hagen, J.H.: The Turnover of Glycerol in Plasma, Life Sci. 3 (1963) 170
41. Hagen, J.H.: The effect of Hormones on Glycerol Level in Blood, Fed. Proc. 20, (1961) 204
42. Hagen, J.H. and Hagen, P.B.: An encymatic method for the estimation of Glycerol in blood and its use to determine the effect of noradrenaline on the concentration of Glycerol in blood. Canad. J. Biochem. Physiol. 40 (1962) 1129
43. Hagen, J.H., J.A. Moorhouse and J. Steinberg: Effect of Insulin on Plasma-Glycerol in man. Metabolism 18, 346-351 (1963)
44. Harding V. und G. Heinzel: Vollautomatische enzymatische Bestimmung des freien Glycerins im Blut mit dem Auto-Analyzer. Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 7 (1969) 356
45. Harvey, S.G.: J. of Biol. Chem. 179, (1949) 435
46. Hastings, A.B., J. Ashmore and G.F. Cahill, jr.: Arch. of Biochem a. Biophysics 65 (1956) 78

47. Hauge, J.G., T.E. King and V.H. Cheldelin:
Federat. Proc. 13 (1954) 225

48. Havel R.J. and L.A. Carlson: Comperative turnover rates of free fatty acids and glycerol in blood of dogs under various conditiones.
Life Sci. 2 651-658 (1963)

49. Hermann G. persönliche Mitteilung 1969, Bad Mergentheim

50. Hoeflmayr J. und R. Fried: Eine rasch durchführbare Methode zur Bestimmung des freien Cholesterins.
Med. Welt 38 (1964) 2015

51. Hoeflmayr J. und R. Fried: Therap. d. Geg. 104, (1965) 208

52. Hohorst, H.J., F.H. Kreutz u. Th. Bücher: Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentration in der Leber der Ratte. Biochem. Z. 332 (1959) 18 - 46

53. Hohorst, H.J.: Enzymatische Bestimmung der L (+) Milchsäure. Biochem. Z. 328 (1957) 509

54. Holst, E.J.: Glycerol oxydation in the animal organism.
Acta physiol. scand 7, 69-79 (1944)

55. Holt, P.R.: Utilisation of glycerol- C^{14} for intestinal glyceride-esterification.
J. clin. invest. 43, 349-356 (1964)

56. Howorth P.J.N, S. Gibbard and V. Marks: Evaluation of a colorimetric method of determination of plasma non-esterified fatty acids.
Clin. Chim. Acta 44 (1966) 69

57. Iwayama, Y (1959: J. pharm. Soc. Japan 79,(1959) 552

58. Jahnke, K., F.A. Gries, H. Wallenfels und H. Schulte.
Klin. Wschr. 42 (1964) 1016

59. Kabanchik M., F.J. Fernandez, B. Sermukslis, R. Schmud and G. Palermo: Evaluation of Glycerol Intravenous Tolerance Test in Different Hepatobiliary Disease in Proceedings of the 3rd World Congress of Gastroenterology Tokyo 1966 in Resent ad vances in Gastroenterology Vol. III

60. Kalckar, H.: Enzymologia 2 (1937) 47 und 5 (1939) 365
61. Kennedy, E.P. and S.B. Weiss: J. Amer Chem. Soc. 77 (1955) 250
62. Kennedy, E.P.: J. of Biolog. Chemistry 201 (1953) 399
63. Kornberg, A. and W.E. Pricer: J. of Biol. Chem. 204, (1953) 345
64. Koschinsky, Th., F.A. Gries, L. Herberg: Vortrag auf Herbsttagung der Gesellsch. f. Biolog. Chemie und Klinische Chemie Bad Neuenahr 1970 und Diabetologia im Druck.
65. Krainick, H.G.: Bestimmung des Lipoidphosphors in kleinen Blutmengen. Klin. Wschr. 17 (1938) 706
66. Kreutz, F.H.: Enzymatische Glycerinbestimmung. Klin. Wschr. 40 (1962) 362
67. Lang, R.M.: Biochemic. J. 9 (1915) 456
68. Laurell S. and G. Tibbling: The use of Blood Glycerol Determination in the Diagnosis of Hyperthyreodism. Clin. Chim. Acta 21 (1968) 127
69. Laurell S. and G. Tibbling: An enzymatic fluorometric mikromethod for the determination of Glycerol
70. Leffler, H.H.: Amer. Journ. Clin. Pathol. 31 (1959) 310
71. Liebermann, C.: Über das Oxychinoterpen. Ber. dtsch. chem. Ges. 18 (1885) 1803
72. Lindberg, O.: Biochim et Biophysica Acta, 7, (1951) 349
73. Löffler G. and L. Weiss: Lipase activities in adipose tissue. Horm. Metabolism Res., Suppl. 2 (1970) 32
74. Luethje, H.: Die Zuckerbildung aus Glycerin. Deutsch. Arch. Klin. Med. 80, 98-104 (1904)
75. Magasanik, B., M.S. Brooke and D. Karibian: J. Bacter 66, (1953) 611
76. Meyerhof, O.: Pflügers Arch. 175 (1919) 65

77. Miettinen, T.A., Pelkonen, R. Vesenne, M.R. and Nikkilä, E.
Effects of Plasmatriglyceride, FFA and glycerol levels on plasma insulin and its response to glucose.
Diabetologia 2 (1966) 232

78. Migicovsky, B.B.: Glycerol as an inhibitor of Cholesterol synthesis.
Can. J. Biochem. 46, (1968) 859

79. Newsholme, E.A. and Taylor K.: Glycerol Kinase in Muscles from Vertebrates and Invertebrates .
Biochim J. 112, (1969) 465

80. Newsholme, E.A., Robinson J. and Taylor K.:
Aradiochemical enzymatic Activity Assay for Glycerol kinase and Hexokinase.
Biochim et Biophys. Acta 132, (1967) 338

81. Parijs, J., F. Barbier and P. Vermeire:
Enzymatic Determination of Glycerol and Glyceride-Glycerol in Plasma.
Z. Klin. chem. u. klin. Biochem. 6,(1968) 4, 331

82. Pearson, S., Stern, S. and Mc Gavack:
A rapid, Accurate Method for the Determination of Total Cholesterol in Serum.
Anal. Chem. 25 (953) 813

83. Pelkonen, R., T.A. Miettinen, M.R. Taskinen and E.A. Nikkilä
Effect of acute Elevation of Plasma Glycerol, Triglyceride and FFA Levels on Glucose Utilisation and Plasma Insulin. Diabetes 17,(1968) 76

84. Pelkonen, R., E.A. Nikkilä and M. Kekki: Metabolism of Glycerol in Diabetes Mellitus.
Diabetologia 3, (1967) 1-8

85. Rizack, M.A.: An eninephrine sensitive lipolytic activity in adipose tissue. J. biol. Chem. 236, (1961) 657

86. Robinson, J. and Newsholme, E.A.:
Biochem. J. 104, (1967) 2c

87. Rosenthal, H.L., M.L. Pfluke and J. Callerami:
Clin. Chim. Acta 4 (1959) 329

88. Rößle und Roulet: Maß und Zahl in der Pathologie (1932) S. 58

89. Saunders, D.R. and A.M. Dawson: Studies on the Metabolism of glycerol by the small intestine in vitro and in vivo. Biochem. J. 82, 477-483 (1962)

90. Searcy, R.L. and L.M. Bergquist: A new Color Reaction for the Quantitation of Serum Cholesterol. Clin. Chim. Acta 5, (1960) 192

91. Shafrir,E. and E. Gorin: Release of Glycerol in Conditions of Fat Mobilisation and Deposition. Metabolism 12, (1963) 580

92. Shapiro,I.: J. of Biol. Chem. 108 (1935) 373

93. Sitzmann, F.C.: Untersuchungen mit der Ultramikromethode zur quantitativen Bestimmung des Serum-Cholesterins. Klin. Wschr. 42, (1964) 1030

94. Spinella, C.J. and M. Mager: Modified encymatic Procedure for routine determination of glycerol and triglyceride in Plasma. J. of Lipid Res. 7, (1966) 167

95. Schlierf, G. und W. Kahlke: in Klinische Pathophysiologie Thieme Verlag Stuttgart 128 (1970)

96. Schoenheimer, R. and Sperry, W.M.: A micromethod for the determination of free and combined cholesterol. J. Biol. Chem. 106, (1934) 745

97. Schwarz, K., K.P. Eymer, K. Kopetz und K.F. Weinges: Normalwerte des Glycerins im menschlichen Serum und deren Veränderung nach Arterenol-Injektion. Klin. Wschr. 39 (1961) 975

98. Schwarz, K., P. Bottermann, G. Claussen, K. Kopetz und K.P. Eymer: Untersuchungen über die Resorption und die biolog. Halbwertszeit von Glycerin beim Menschen. Klin. Wschr. 40, (1962) 1183

99. Strack, E., H. Theile und H. Reinhold: Glycerinumsatz beim alloxandiabetischen Kaninchen. Z. ges. exp. Med. 134, 407-422 (1961)

100. Stuart, H.C. and Stevenson, S.S.: Physical Growth and Development Philadelphia 1950
101. Sture A. Siwe: Stufenphotometische Bestimmung von Phosphor in kleinen Blutmengen. Biochem. Z. 278 (1935) 437
102. Teorell: Biochem. Zeitschr. 230 (1931) 1
103. Teorell und Wildström: Zeitschr. exper. Med. 75 (1931) 69
104. Thomas, H.M., Jr.: Glycerin, its Use as an Antiketogenic Substance in the Diet of Diabetic Patients. Bull Hopkins Hosp. 35 (1924) 201
105. Thorell, J., Persson, B. and Steikey, G.: Effect of fat infusion on plasma glucose, FFA, glycerol and Insulin levels during intravenous and oral Glucose tolerance tests. Diabetologia 2 (1966) 2
106. Tibbling, G.: Glycerol Turnover in Hyperthyroidism. Clin. Chim. Acta 24 (1969) 121
107. Vaughan, M.: J. Biolog. Chem. 237 (1962) 3354
108. Vaughan, M., J.E. Berger and D. Steinberg: Hormone sensitive Lipase and monoglyceride Lipase activities in adipose tissue. J. Biolog. Chemistray 239 (1964) 436
109. Vernon, R.G. and D.G. Walker: Glycerol Metabolism in the Neonatal Rat. Biochem. J. 118 (1970) 531-536
110. Watson, D: A simple method for the determination of Serum-Cholesterol. Clin. Chim. Acta 5, (1960) 637-643
111. Weiss, L., G. Löffler und O. Wieland: in "Die Zuckerkrankheit" aus "Klinik d. Gegenwart". Verlag Urban und Schwarzenberg, München XI (1970) 15
112. Weiss, S.B. and E.P. Kennedy: The encymatic synthesis of Triglycerides. J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 3550
113. Weiss, S.B. and E.P. Kennedy: J. Amer. Chem. Soc. 78, (1956) 3550
114. Wieland, O: Eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Glycerin. Biochem. Zeitschr. 329 (1957) 313

115. Wieland, O.: Wechselbeziehungen zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und ihre Störungen. 8. Colloquium der Gesellschaft für physiol Chemie, Mosbach 1957. Springer-Verlag Berlin-Göttingen, Heidelberg (1958) S. 86

116. Wieland, O.: "Glycerin" in H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim (1962)

117. Wieland, O. und F. Matschinsky: Zur Natur der antiketogenen Wirkung von Glycerin und Fructose. Life Sciences 2, (1962) 49

118. Wieland, O. und J. Neufeld: unveröffentlicht 1962

119. Wieland, O. und M. Suyter: Glycerokinase: Isolierung und Eigenschaften des Enzyms. Biochem. Zeitschr. 329 (1957) 320

120. Wieland, O.: Der intermediäre Stoffwechsel des Fettgewebes im Hinblick auf die Koordination des Energiehaushaltes. 12. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie. Wiesbaden 1966

121. Wieland, O.: Ketogenesis and its regulation. Adv. in Metabolic Disorders 3 (1968) 1

122. Winkler, B., J. Rathgeb, R. Steele and N. Altszuler: Conversion of Glycerol to glucose in the normal dog. Amer. J. of Physiology 219, (1970) 497

Zu großem Dank bin ich verpflichtet
Herrn Prof. Dr. Otto Wieland für sein
Verständnis, seinen unermüdlichen, stets
freundlichen Rat, seine Unterstützung im
Labor, wie auch bei der Abfassung der Ar-
beit, sowie für seine Geduld in den Zei-
ten schicksalhafter Unterbrechung.

Ebenfalls danke ich Herrn Chefarzt
Dr. L. Wannagat für seine verständnisvol-
le Erlaubnis, besonders aber Herrn
Dr. G. Hermann für die Zurverfügungstel-
lung seiner Laboratorien, seine sachkun-
dige Beratung und tatkräftige Unterstüt-
zung in allen Nöten, ohne die eine Weiter-
führung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dank sei auch meinen Chefärzten Herrn Dr. Boecker,
Bad Mergentheim und Herrn Dr. Anhegger, Geislin-
gen (Steige) für ihre verständnisvolle Groß-
zügigkeit.

Besonders danke ich auch meiner Frau für alle
auf sich genommenen Entsagungen und liebevollen
Unterstützungen in Zeiten selbst tief erlebter
Not.

Lebenslauf

Geboren am 8. Nov. 1927 als 2. Sohn des Oberlehrers Otto Feigenbutz und dessen Ehefrau Therese geb. Geiger, besuchte ich nach 4-jähriger Grundschulbildung das Lessing-Realgymnasium Mannheim.

Mit 14 Jahren (im Juli 1943) Einsatz bei schwerer Flak-Artillerie in Ludwigshafen, daneben Schulweiterbildung. Ab Herbst 1944 Infanterie-Einsatz an der damaligen Westfront. Nach Kriegsende, kurzer amerikanischer Gefangenschaft, sowie mehrmonatigem Arbeitseinsatz als Waldarbeiter konnte ich meine Schulbildung an den Vereinigten Realgymnasien Mannheim fortsetzen. Reifeprüfung am 8. Juli 1947. Danach Praktikum bei der Fa. Daimler Benz, Mannheim mit dem Ziel des Studiums der Flugzeugtechnik an der Techn. Hochschule Karlsruhe. Danach Entscheidung zum Studium der Medizin. Wegen des Numerus clausus 9 Monate Praktikum am Pathologischen Institut Mannheim. Dann ab Wintersemester 1949/50 Studium an der Universität Kiel. Nach 4 Semester Studium und gleichzeitiger Ausbildung in Labor und Röntgen nahm ich ein Jahr lang ein Angebot zum Groothuek-Missions-Hospital, einem 180-Betten-Krankenhaus in Naboomspruit in Nord-Transvaal, Süd Afrika an und führte Labor und Röntgenabteilung selbständig medizinisch-technisch. Nach Rückkehr Unterbrechung des Studiums wegen Krankheit.

Ab Sommersemester 1954 Studium an der Universität Basel. Ab Sommersemester 1956 Fortsetzung des Studiums an der Universität München. Dort legte ich die ärztliche Prüfung am 21. Dez. 1959 ab.

Bereits im Herbst 1956 hatte ich meine Dissertationsarbeit bei Herrn Prof. Dr. O. Wieland an der II. Med. Klinik in München begonnen.

Ab März 1960 war ich als Medizinalassistent an der II. Med. Klinik bei Prof. Dr. G. Bodechtel. Dann wollte ich meine Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. O. Wieland abschließen. Dies wurde jedoch durch den plötzlichen unerwarteten Tod meines Vaters und gleichzeitig schwere Erkrankung meiner Mutter unterbrochen.

In einer Interimszeit, während der ich aus familiären Gründen keine Ganztagsstelle bekleiden konnte, erstattete ich medizinische Gutachten für die Universitätsklinik. Dann absolvierte ich die Chirurgiezeit im Knappschaftskrankenhaus Peißenberg, die Gynäkologiezeit im Kreiskrankenhaus Memmingen und erhielt die ärztliche Approbation am 30. Juni 1963.

Anfang 1963 heiratete ich. Wir haben inzwischen 3 Kinder, 7, 4 und 3 Jahre alt.

Meine interne Facharztausbildung erhielt ich bei Herrn Chefarzt Dr. Borst im Kreiskrankenhaus Memmingen, 1 Jahr, 4 Jahre bei Herrn Chefarzt Dr. Boecker im klinisch geführten Sanatorium am Frauenberg in Bad Mergentheim und 2 Jahre bei Herrn Chefarzt Dr. Anhegger, Kreiskrankenhaus Geislingen (Steige), sowie bei Herrn Chefarzt Dr. Neppert an der Röntgen-Abteilung desselben Hauses. Im Juli 1970 erhielt ich die Anerkennung als Facharzt für Innere Medizin.

Im Oktober 1970 verunglückte unser jüngster Sohn schwer und ist seither durch einen hypoxischen Gehirnschaden spastisch gelähmt. Durch dieses Ereignis ist seit 3/4 Jahren mein Berufsweg behindert. Am 1. 7. 1971 will ich in Mannheim eine interne Facharztpraxis übernehmen.

Seit November 1966 konnte ich an der Stoffwechselklinik in Bad Mergentheim gemeinsam mit Herrn Oberarzt Dr. G. Hermann unter der Regie von Herrn Prof. Dr. O. Wieland meine Anfang 1961 unterbrochene Dissertationsarbeit wieder aufnehmen und in erweiterter Form jetzt zu Ende führen.